

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MILENA KALEGARI

COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
***Rourea induta* PLANCH, CONNARACEAE**

CURITIBA
2009

MILENA KALEGARI

**COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE
Rourea induta PLANCH, CONNARACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profº Doutor *Obdulio Gomes Miguel*

Co-orientadora: Profª Drª *Marilis Dallarmi Miguel*

CURITIBA
2009

Kalegari, Milena

Composição Fitoquímica e Atividades Biológicas de *Rourea induta* Planch, Connaraceae / Milena Kalegari – Curitiba: UFPR, 2009.
[17], 119 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: Obdulio Gomes Miguel e Marilis Dallarmi Miguel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, UFPR, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, 2009.

Referências bibliográficas: f. 115-119

1. *Rourea induta*. 2. Connaraceae. 3. Flavonóides. 4. Atividade Antioxidante. 5. Alelopatia. 6. Atividade Antimicrobiana. 7. Toxicidade. 8. Espectroscopia. 9. Fitoquímica - Tese. I. Miguel, Obdulio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

“A arte da vida consiste em fazer da vida uma obra de arte”

(Mahatma Gandhi)

AGRADECIMENTOS

*Primeiramente a **Deus** pela minha vida.*

*Aos meus pais **Dilma e José**, aos meus irmãos **Diego e Paloma** e a toda **minha família** pelo apoio, incentivo, dedicação, compreensão, carinho e amor incondicionais.*

*À **Universidade Federal do Paraná** e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.*

*Ao meu orientador **Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel** pela dedicação, confiança, paciência, ensinamentos e amizade.*

*À minha co-orientadora **Profª Dra. Marilis Dallarmi Miguel** pelos ensinamentos, confiança e amizade.*

*Ao Engenheiro Agrônomo **João Batista Barcelos** e ao Sr. **Enio Jonas Karkle** pela coleta e envio do material vegetal.*

Ao Laboratório de RMN da Universidade Estadual de Maringá pelos espectros de ressonância magnética nuclear.

*À **Profª Dra. Ana Luísa Lacava Lordello**, do Departamento de Química da UFPR, pela contribuição e dedicação na análise dos espectros de RMN.*

*Ao Laboratório de Controle de Qualidade II, do Departamento de Farmácia da UFPR, representado pela **Profª. Wanda N. Abrahão e Geni Peruzzo**, pela contribuição na atividade antimicrobiana.*

*Às colegas de mestrado **Andressa e Roberta** pela amizade e companheirismo.*

*Às doutorandas **Josiane de Fátima G. Dias, Cristina Peitz, Cláudia A. Andrade e Cristina Mayumi S. Miyasaki** pelo companheirismo, apoio e sugestões.*

A todos os colegas de mestrado pela amizade.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	9
	LISTA DE GRÁFICOS	12
	LISTA DE TABELAS	13
	LISTA DE SIGLAS	14
	LISTA DE SÍMBOLOS	15
	RESUMO	16
	ABSTRACT	17
1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVO	20
2.1	OBJETIVO GERAL.....	20
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3	REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1	O CERRADO BRASILEIRO	21
3.2	FAMÍLIA CONNARACEAE	23
3.2.1	Aspectos Botânicos	23
3.2.1.1	Gênero <i>Rourea</i>	24
3.2.2	Atividades Biológicas da Família	26
3.3	COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	29
3.3.1	Flavonóides	29
4	METODOLOGIA DA PESQUISA	32
4.1	MATERIAL BOTÂNICO	32
4.2	ENSAIO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	32
4.2.1	Metabólitos Solúveis em Álcool.....	32
4.2.1.1	Pesquisa de alcalóides	33
4.2.1.2	Pesquisa de leucoantocianidinas	34

4.2.1.3	Pesquisa de heterosídeo flavônico	34
4.2.1.4	Pesquisa de flavonóis	34
4.2.1.5	Pesquisa de dihidroflavonois	34
4.2.1.6	Pesquisa de cumarinas	35
4.2.1.7	Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos	35
4.2.1.8	Pesquisa de esteróides e triterpenos.....	36
4.2.2	Metabólitos Solúveis em Água	37
4.2.2.1	Pesquisa de heterosídeos antociânicos	37
4.2.2.2	Pesquisa de heterosídeos saponínicos	37
4.2.2.3	Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos	38
4.2.2.4	Pesquisa de taninos	38
4.2.2.5	Pesquisa de ácidos voláteis	39
4.2.2.6	Pesquisa de ácidos fixos	39
4.2.2.7	Pesquisa de amino grupo	40
4.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES.....	40
4.4	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS	40
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	41
4.5.1	Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio	41
4.5.2	Potencial Antioxidante por Cromatografia de Camada Delgada.....	42
4.5.3	Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazila)	42
4.6	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	44
4.6.1	Preparo da Solução Salina	44
4.6.2	Eclosão dos Ovos.....	44
4.6.3	Preparo da Amostras.....	45
4.6.4	Avaliação da Toxicidade.....	45
4.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA	46

4.7.1	Preparo do Teste	46
4.7.2	Teste de Germinação	47
4.7.3	Teste de Crescimento.....	47
4.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	48
4.8.1	Difusão em Ágar.....	48
4.8.1.1	Preparo das amostras	48
4.8.1.2	Preparo dos discos de papel	48
4.8.1.3	Meio de cultura	49
4.8.1.4	Preparo do inóculo.....	49
4.8.1.5	Teste de atividade antibacteriana	49
4.8.2	Avaliação da Concentração Inibitória Mínima.....	50
4.8.2.1	Preparo das amostras	50
4.8.2.2	Preparo do inóculo.....	51
4.8.2.3	Teste de concentração inibitória mínima	51
4.9	FLUXOGRAMA DA PESQUISA	52
5	RESULTADOS	53
5.1	PESQUISA DE GRUPOS FITOQUÍMICOS.....	53
5.2	PREPARAÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES.....	55
5.3	ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.....	55
5.3.1	Identificação da Substância M1	57
5.3.2	Identificação da Substância M2.....	61
5.3.3	Identificação da Substância M3.....	68
5.3.4	Identificação da Substância M4.....	78
5.3.5	Identificação da Substância M5.....	86
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	95
5.4.1	Ensaio pelo Método da Redução do Complexo do Fosfomolibdênio	95
5.4.2	Potencial Antioxidante por Cromatografia em Camada Delgada.....	97

5.4.3	Ensaio pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)	98
5.5	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SOBRE <i>Artemia Salina</i>	103
5.6	ATIVIDADE ALELOPÁTICA	104
5.6.1	Avaliação da Germinação.....	105
5.6.2	Avaliação do Crescimento	106
5.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	109
5.7.1	Difusão em Agar.....	109
5.7.2	Concentração Inibitória Mínima	111
6	CONCLUSÃO	113
	REFERÊNCIAS	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Distribuição Geográfica do Cerrado no Brasil.	22
Figura 2	– Apresentação Geográfica da Família Connaraceae.....	24
Figura 3	– Foto <i>Rourea induta</i> , Connaraceae	25
Figura 4	– Prancha Botânica <i>Rourea induta</i>	25
Figura 5	– Estrutura Química do Rourinosideo (1) e Rouremina (2)	27
Figura 6	– Estrutura Básica de Flavonóides.....	29
Figura 7	– Estrutura da Miricetina e Quercetina	30
Figura 8	– Estrutura Química do Difenilpicrilhidrazila – Radical Livre (1), e Difenilpicrilhodrazine – Radical Reduzido (2)	43
Figura 9	– Perfil Cromatográfico de Pureza do Composto M2	56
Figura 10	– Espectro de Absorção no Infravermelho da Substância M1.....	58
Figura 11	– Espectro de RMN- ¹³ C da Substância M1	59
Figura 12	– Espectro de RMN- ¹ H da Substância M1	60
Figura 13	- Espectro de Massa da Substância M1	60
Figura 14	– Espectro de Absorção no Infravermelho da Substância M2	61
Figura 15	– Espectro de Absorção no UV da Substância M2 com NaOAc e H ₃ BO ₃	62
Figura 16	– Espectro de Absorção no UV da Substância M2 com AlCl ₃ e HCl.	62
Figura 17	– Expansão do Espectro de RMN- ¹³ C (137-177ppm) da Substância M2.....	65
Figura 18	– Expansão do Espectro de RMN- ¹³ C (94-124ppm) da Substância M2.....	65
Figura 19	– Expansão do Espectro de RMN- ¹ H (7,4-7,8ppm) da Substância M2.....	66

Figura 20 – Expansão do Espectro de RMN- ¹ H (6,2-6,9ppm) da Substância M2.....	66
Figura 21 – Espectro DEPT da Substância M2.....	67
Figura 22 – Espectro gHSQC da Substância M2	67
Figura 23 – Estrutura Química da Quercetina.....	68
Figura 24 – Espectro de Absorção no Infravermelho da Substância M3.....	69
Figura 25 – Espectro de Absorção no UV da Substância M3 com NaOAc e H ₃ BO ₃	70
Figura 26 – Espectro de Absorção no UV da Substância M3 com AlCl ₃ e HCl .	70
Figura 27 – Espectro de RMN- ¹³ C da Substância M3.....	73
Figura 28 – Espectro de RMN- ¹ H da Substância M3	74
Figura 29 - Expansão do Espectro de RMN- ¹ H (5,5-7,5ppm) da Substância M3.....	75
Figura 30 - Expansão do Espectro de RMN- ¹ H (3,3-4,3ppm) da Substância M3.....	75
Figura 31 – Expansão do Espectro de RMN- ¹ H (5,5-6,20ppm) em DMSO-d ₆ da Substância M3	76
Figura 32 – Expansão do Espectro gHSQC (94-123ppm) da Substância M3....	76
Figura 33 – Expansão do Espectro gHSQC (62-88ppm) da Substância M3.....	77
Figura 34 – Espectro DEPT da Substância M3.....	77
Figura 35 – Estrutura Química da Quercetina-3-O-α-arabinofuranosideo	78
Figura 36 – Espectro de Absorção no UV da Mistura M3 e M4 com NaOAc H ₃ BO ₃	79
Figura 37 – Espectro de Absorção no UV da Mistura M3 e M4 com AlCl ₃ e HCl.....	79
Figura 38 – Espectro de Absorção no Infravermelho da Mistura M3 e M4.....	80
Figura 39 - Comparação do espectro de RMC- ¹³ C da Mistura M3 e M4 com o Espectro de RMN- ¹³ C do Composto M3 Puro	83

Figura 40 - Comparação do Espectro de RMN- ¹ H da Mistura de M3 e M4 com o Espectro de RMN- ¹ H do Composto M3 Puro.....	84
Figura 41 - Expansão do Espectro RMN- ¹ H (5,1-5,5ppm) da Mistura M3 e M4	85
Figura 42 - Estrutura Química da Quercetina – 3-O β-xilosideo	85
Figura 43 - Espectro de Absorção no Infravermelho da Substância M5.....	86
Figura 44 - Espectro de Absorção no UV da Substância M5 com NaOAc e H ₃ BO ₃	87
Figura 45 - Espectro de Absorção no UV da Substância M5 com AlCl ₃ e HCl .	87
Figura 46 – Espectro de RMN- ¹³ C da Substância M5.....	90
Figura 47 – Espectro de RMN- ¹ H da Substância M5	91
Figura 48 – Expansão do Espectro de RMN- ¹ H (6,2-7,7ppm) da Substância M5.....	92
Figura 49 - Expansão do Espectro de RMN- ¹ H (2,5-3,7ppm) da Substância M5.....	92
Figura 50 - Expansão do Espectro de RMN- ¹ H (4,3-5,5ppm) da Substância M5.....	93
Figura 51 – Espectro HMQC da Substância M5.....	93
Figura 52 – Espectro DEPT da Substância M5.....	94
Figura 53 – Estrutura Química da Hiperina	94
Figura 54 – Reação de Complexação do Fosfomolibdênio.....	97
Figura 55 – Cromatografia em Camada Delgada com Revelador DPPH.....	98
Figura 56 – Atividade Antibacteriana contra <i>Staphylococcus epidermidis</i>	110
Figura 57 – Concentração Inibitória Mínima da Hiperina contra <i>S. epidermidis</i> .	112

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Porcentagem de Inibição do Complexo do Fosfomolibdênio	97
Gráfico 2 – Curva da Vitamina C pela Redução do DPPH	99
Gráfico 3 – Curva da Rutina pela Redução do DPPH	99
Gráfico 4 – Curva da Fração Clorofórmio pela Redução do DPPH	100
Gráfico 5 – Curva da Fração Acetato de Etila pela Redução do DPPH.....	100
Gráfico 6 – Curva da Hiperina pela Redução do DPPH	100
Gráfico 7 – Curva da Fração Hexano 1 pela Redução do DPPH	101
Gráfico 8 – Curva da Fração Hexano 2 pela Redução do DPPH	101
Gráfico 9 – Médias de Germinação de Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	106
Gráfico 10– Porcentagem de Crescimento do Hipocótilo de Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração Final das Amostras no Teste CIM.....	51
Tabela 2 – Análise Sistemática do Extrato Hidroalcoólico a 20%	53
Tabela 3 – Análise Sistemática do Extrato Aquoso.....	54
Tabela 4 – Resíduo Seco das Frações do Extrato Bruto de <i>Rourea induta</i>	55
Tabela 5 – Deslocamentos Químicos de RMN- ¹³ C da Substância M1	58
Tabela 6 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN- ¹³ C e RMN- ¹ H da Substância M2	64
Tabela 7 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN- ¹³ C e RMN- ¹ H da Substância M3	72
Tabela 8 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN- ¹³ C e RMN- ¹ H da Mistura M3 e M4	81
Tabela 9 - Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN- ¹ H da Mistura M3 e M4 .	82
Tabela 10 - Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN- ¹³ C e RMN- ¹ H da Substância M5	89
Tabela 11 – Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio.....	96
Tabela 12 – Resultado de IC ₅₀ e Teste de Tukey para Redução do DPPH	102
Tabela 13 – Mortalidade de <i>Artemia salina</i> e DL ₅₀	103
Tabela 14 – Teste de Scott-Knott para o Índice de Velocidade de Germinação das Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	105
Tabela 15 – Teste de Scott-Knott para Avaliação do Crescimento da Radícula e Hipocótilo de Sementes de <i>Lactuca sativa</i>	107
Tabela 16 – Média dos Halos de Inibição por Difusão em Ágar	109

LISTA DE SIGLAS

ATCC	– American Type Culture Collection
CCD	– Cromatografia em Camada Delgada
CG/EM	– Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massa
CIM	– Concentração Inibitória Mínima
CLAE	– Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IVG	– Índice de Velocidade de Germinação
UV	– Ultravioleta
IV	– Infravermelho
RMN- ¹³ C	– Ressonância Magnética Nuclear de Carbono -13
RMN- ¹ H	– Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>d</i>	- Dubleto
<i>dd</i>	- Duplo dubleto
<i>sl</i>	- Singleto Largo
<i>J</i>	- Constante de Acoplamento

LISTA DE SÍMBOLOS

%	– Por cento
µg	– Micrograma
µL	– Microlitro
g	– Grama
mL	– Mililitro
°C	– Graus Celsius
M	– Molar
mg/mL	– Miligrama por mililitro
N	– Normal
nm	– Nanômetro
m	– Metro
cm	– Centímetro
µg/mL	– Micrograma por mililitro
DL ₅₀	– Dose letal média
IC ₅₀	– Concentração inibitória média
v/v	– Volume/volume
HCL	– Ácido clorídrico
NaOH	– Hidróxido de sódio
NH ₄ OH	– Hidróxido de amônio
H ₂ SO ₄	– Ácido sulfúrico
pH	– Potencial hidrogeniônico
MgCl ₂ .6H ₂ O	– Cloreto de magnésio hexaidratado
Na ₂ SO ₄	– Sulfato de sódio
CaCl ₂ .2H ₂ O	– Cloreto de cálcio biidratado
CaCl ₂ .6H ₂ O	– Cloreto de cálcio hexaidratado
KCl	– Cloreto de potássio
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	– Molibdato de amônio tetraidratado
Na ₃ PO ₄	– Fosfato de sódio
AlCl ₃	– Cloreto de alumínio
NaOAc	– Acetato de sódio
H ₃ BO ₃	– Ácido bórico
CD ₃ OD	– Metanol deuterado
DMSO-d ₆	– Dimetilsulfóxido deuterado
CDCl ₃	– Clorofórmio deuterado

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a espécie *Rourea induta* Planch, pertencente à família Connaraceae. Este estudo foi realizado a partir das folhas desta espécie coletadas na cidade de Rondonópolis, estado do Mato Grosso, com as quais se preparou um extrato etanólico bruto que foi fracionado em porções de acordo com a polaridade dos constituintes. A partir das amostras obtidas foram separados cinco compostos por meio de colunas cromatográficas, os quais foram identificados por espectroscopia de ultravioleta, infravermelho, RMN ^{13}C e RMN ^1H , como um hidrocarboneto de cadeia longa, n-tetracosano, e quatro flavonóides: quercetina e três derivados glicosilados; quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo, quercetina-3-O- β -xilósídeo e quercetina-3-O- β -galactosídeo (hiperina). O estudo de algumas atividades biológicas, com as frações e substâncias isoladas, revelaram grande capacidade antioxidante da espécie pelo método da redução do complexo do fosfomolibdênio e redução do radical DPPH, principalmente nas frações acetato de etila, clorofórmio e no flavonóide isolado hiperina, apresentando um potencial antioxidante maior do que a vitamina C. Essas amostras também demonstraram inibição do crescimento de duas cepas bacterianas, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, pelos métodos de difusão em Agar e concentração inibitória mínima. A atividade alelopática foi demonstrada pela inibição do crescimento do hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa* na presença da fração hexano e do n-tetracosano. Com relação ao teste de toxicidade sobre o microcústáceo *Artemia salina*, as amostras não apresentaram atividade no modelo testado.

Palavras chave: *Rourea induta*, Connaraceae, atividade antimicrobiana e antioxidante, alelopatia, flavonóides.

ABSTRACT

This work aimed to study the specie *Rourea induta* Planch, belonging to the family Connaraceae. This study was conducted from the leaves of this specie collected in the city of Rondonópolis, the state of Mato Grosso, which are prepared a crude ethanol extract, that was fragmented into portions according to the constituents polarity. From these samples were separated five compounds, by chromatography columns, which were identified by ultraviolet, infrared, RMN ^{13}C and RMN ^1H spectroscopy, as a long chain hydrocarbon, n-tetracosane, and four flavonoids: quercetin and three glycosylated derivatives; quercetin-3-O- α -arabinofuranoside, quercetin-3-O- β -xyloside and quercetin-3-O- β -galactoside (hyperin). The study of some biological activities, with fractions and isolated compounds, showed high antioxidant capacity of the specie, through phosphomolybdenum complexometry method and radical DPPH reduction, mainly in ethyl acetate and chloroform fractions, and the isolated flavonoid hyperin, showing an antioxidant potential higher than the vitamin C activity. These samples also showed growth inhibition of two bacteria strains, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*, by agar diffusion and minimal inhibitory concentration methods. The allelopathic activity was demonstrated by hypocotyls growth inhibition of *Lactuca sativa* seeds in the presence of hexane fraction and the n-tetracosane. Regarding the toxicity test through micro crustacean *Artemia salina*, the samples showed no activity in the model tested.

Key words: *Rourea induta*, Connaraceae, antimicrobial activity and antioxidant, allelopathy, flavonoids.

1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas como medicamento provavelmente seja tão antiga quanto o aparecimento do próprio homem. A preocupação com a cura de doenças, ao longo da história da humanidade, sempre se fez presente. (SOSSAE, 2007). A utilização de plantas é uma prática generalizada baseada na crença popular e nas formações culturais que as usam como recurso terapêutico, mas apesar do emprego empírico as plantas continuam a ser usadas pela população e jamais foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos (BRESOLIN e FILHO, 2003).

A planta torna-se medicamento somente quando é usada corretamente. Portanto, a recomendação do seu uso como verdadeiramente medicinal, validada e incluída na farmacopéia requer ter identificado seu princípio ativo ou tê-lo evidenciado farmacologicamente. Para isso devem ser desenvolvidos estudos farmacológicos, pré-clínicos, toxicológicos e químicos visando o isolamento e caracterização da substância ativa. As plantas medicinais só diferem dos medicamentos industriais apenas pela embalagem e pelas substâncias corantes, aromatizantes, flavorizantes, encorpantes e conservantes que acompanham a substância ativa nesse tipo de medicamento (LORENZI e MATOS, 2002).

As plantas produzem substâncias resultantes do metabolismo secundário que se diferencia do metabolismo primário, basicamente por não apresentar reações e produtos comuns à maioria das plantas, sendo, portanto específico de determinados grupos (SOSSAE, 2007).

Os compostos secundários podem ter efeitos, para o homem, medicinal ou tóxico e, para a planta, dado que existe uma interação dela com o ambiente, os efeitos podem ser no sentido de proteção contra predadores ou como atrativo de polinizadores.

Um dos aspectos mais delicados na fitoterapia, terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, consiste na identidade das plantas. Por ser baseada em nomes populares a verdadeira identidade das plantas pode variar enormemente de uma região para outra, assim como plantas completamente diferentes podem ter o mesmo nome popular, e ainda algumas plantas têm uma variedade de nomes para a mesma espécie (LORENZI e MATOS, 2002).

Em particular, a flora brasileira é riquíssima em exemplares de plantas que são utilizadas pela população como plantas medicinais. É bem provável que das cerca de 200.000 espécies vegetais que possam existir no Brasil, na opinião de alguns autores, pelo menos a metade pode ter alguma propriedade terapêutica útil à população, mas nem 1% dessas espécies com potencial foi motivo de estudos adequados. O cerrado brasileiro representa cerca de 23% da área total do território nacional, apresentando a maior diversidade vegetal do mundo, pluralidade que está à mercê de estudos por parte da comunidade científica (LORENZI e MATOS, 2002).

Há muita carência de estudos voltados para a identificação dessas plantas que dada à riqueza regional poderia abrigar plantas medicinais que viessem modificar a terapêutica usual. As pesquisas com estas espécies deveriam receber apoio total do poder público, pois, além do fator econômico, há que se destacar a importância para a segurança nacional e preservação dos ecossistemas onde existam tais espécies (HERBARIO, 2007).

A pesquisa na química de produtos naturais resulta de um grupo de pesquisa multidisciplinar, no qual fitoquímicos, botânicos, farmacologistas e microbiologistas corroboram na tentativa de validar as plantas medicinais, visando obter novos agentes químicos (BRESOLIN e FILHO, 2003).

O número de estudos com plantas medicinais tem crescido, no entanto este crescimento é pequeno se comparado com o crescimento da extinção de espécies na flora do país. Portanto faz-se necessário, cada vez mais, estudos sobre os potenciais medicinais de plantas brasileiras ainda não estudadas quimicamente. Considerando as atividades biológicas que tem sido encontradas em espécies da família Connaraceae e a falta de estudos científicos, justifica-se o estudo da espécie *Rourea induta*, Planch.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho tem como objetivo avaliar a composição fitoquímica da espécie *Rourea induta* Planch, Connaraceae, e verificar as atividades antioxidante, alelopática, antimicrobiana e toxicidade dos extratos obtidos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar os constituintes químicos presentes nos extratos das folhas de *Rourea induta*, Planch;
- Determinar a estrutura química de compostos isolados utilizando técnicas espectroscópicas de Ultravioleta, Infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear de ^{13}C e ^1H ;
- Estudar a bioatividade das frações e substâncias isoladas sobre *Artemia salina*;
- Estudar a atividade antibacteriana das frações e substâncias isoladas, frente a diferentes cepas bacterianas;
- Estudar a atividade alelopática das frações e substâncias isoladas;
- Estudar a atividade antioxidante das frações e substâncias isoladas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O CERRADO BRASILEIRO

O Cerrado constitui o segundo maior bioma do Brasil e da América do Sul ocupando mais de 200.000.000 hectares e abrigando um rico patrimônio de recursos naturais adaptados às condições climáticas (RECOR, 2009). Sua área está distribuída, principalmente, pelo Planalto Central Brasileiro, nos estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, parte de Minas Gerais, Bahia e Distrito Federal, abrangendo 196.776.853 ha (figura 1). Há outras áreas de Cerrado, chamadas periféricas ou ecótonos, que são transições com os biomas da Floresta Amazônica, Floresta Atlântica e Caatinga (IBAMA, 2009).

O Cerrado é uma savana tropical na qual uma vegetação rasteira, formada principalmente por gramíneas, coexiste com árvores e arbustos esparsos com troncos e galhos retorcidos e cascas espessas (RECOR, 2009). O solo é nutricionalmente ácido e de baixa fertilidade, o clima é constituído de duas estações bem definidas, seca e úmida. Sua biodiversidade é considerada uma das mais ricas entre as savanas do mundo. Sua flora abrange entre 6 e 10 mil espécies, sendo 4.400 endêmicas, sendo sua riqueza superada somente pela Floresta Amazônica e Floresta Atlântica. Como famílias de maior expressão destacam-se Mimosaceae, Fabaceae, Poaceae, e Asteraceae. A fauna apresenta 837 espécies de aves, 67 gêneros de mamíferos, representados por 161 espécies, das quais 19 endêmicas. Os anfíbios são identificados em 150 espécies, sendo 45 endêmicas (RECOR, 2009). Atualmente graças à irrigação e as técnicas de correção do solo o cerrado é um importante centro de produção de grãos, principalmente soja, feijão, milho e arroz.

Existem vários tipos de cerrado, os quais são classificados de acordo com o tipo de solo, queimadas, umidade e ação do homem, são eles:

- Campo limpo: apresenta arbustos esparsos e ausência de árvores, pode ocorrer em diferentes tipos de solo e topografia, mas é mais comum nas encostas, chapadas e olhos d'água.
- Campo sujo: apresenta arbustos e subarbustos esparsos, solos rasos ou profundos com baixa fertilidade.

- Campo Cerrado: vegetação campestre, com predomínio de gramíneas, pequenas árvores e arbustos bastante esparsos entre si. Pode tratar-se de transição entre campo e demais tipo de vegetação ou, às vezes, resulta da degradação do cerrado.
- Cerrado *Sensu Stricto*: vegetação constituída por árvores e arbustos de até 6m de altura e vegetação rasteira.
- Cerradão: constituído de vegetação com árvores de 8 a 15m de altura, vegetação intermediária e arbustiva.
- Mata Ciliar: vegetação que cresce ao longo dos cursos d'água e linhas de drenagem.
- Matas de Galeria: Vegetação de grande porte que ocorre ao longo de pequenos e córregos no Planalto Central, formando "galerias". Geralmente, as matas de galeria são circundadas por faixa de vegetação não florestal.
- Veredas: são áreas onde o solo está alagado a maior parte do ano, são circundadas por campo limpo e ocorrem em planícies.
- Campos Rupestres: formação herbáceo-arbustiva em regiões com afloramentos rochosos, com solos ácidos e pobres em nutrientes (COSTA, 2008).



Figura 1 – Distribuição Geográfica do Cerrado no Brasil

Fonte: FERRETTI, 2009.

3.2 FAMÍLIA CONNARACEAE

3.2.1 Aspectos Botânicos

A família Connaraceae inclui aproximadamente 16 gêneros, entre 300 e 350 espécies distribuídas pelas regiões tropicais do mundo. Na América estão presentes cinco gêneros; *Bernardinia*, *Cnestidium*, *Connarus*, *Pseudoconnarus* e *Rourea* (FORERO, 2007). O gênero que abrange o maior número de espécies é *Connarus*, com 130 espécies, seguido por *Rourea* com 80 a 90 espécies (BRITANNICA, 2009).

Connaraceae é uma família de angiospermas, podendo se apresentar na forma de plantas lenhosas, árvores ou arbustos. São plantas auto-sustentáveis ou trepadeiras, apresentam folhas alternadas, espirais, pecioladas podendo ser compostas (limbo dividido) ou unifoliadas (limbo inteiro). A epiderme mucilagenosa pode estar presente ou ausente. Comumente os estômatos são paracíticos, nos quais as células da epiderme tem seus eixos longitudinais paralelos as células estomáticas. (WATSON e DALLWITZ, 2007).

Os troncos podem, ou não, apresentar cavidades secretoras de mucilagem. O câmbio se inicia na superfície, o floema interno é ausente em todos os gêneros, exceto na *Rourea*, o qual apresenta um engrossamento se desenvolvendo a partir de um anel convencional ou anômalo do câmbio, quando anômalo, apresenta um abaulamento concêntrico. O xilema apresenta fibras libriformes (menores e mais finas do que as fibrotraqueides), com vasos terminando em paredes simples. As paredes do parênquima são estreitas típicas (WATSON e DALLWITZ, 2007).

Suas flores geralmente são hermafroditas, agregadas em inflorescências, são flores pequenas, em geral branco amareladas, regulares, ou com algumas partes irregulares, são pouco vistosas e bissexuadas. As sépalas, folhas modificadas que protegem o botão floral, são livres ou soldadas na base, em geral persistentes no fruto; pétalas livres entre si ou soldadas até o meio. Os estames se apresentam em número de 10 ou 8, em dois verticilos (androceu) às vezes com filetes soldados na base. O ovário apresenta 5 carpelos livres entre si ou um só com dois óvulos em cada lóculo. Os frutos são secos capsulares, geralmente com um único carpelo desenvolvido, e as sementes possuem arilo vistoso (envoltório do óvulo fecundado) (JOLY, 1985; LORENZI e SOUZA, 2005).

Quanto à fisiologia e bioquímica da família os alcalóides são ausentes, possuem protoantocianidinas (cianidina e delfinidina), flavonóis, canferol, quercetina e miricetina. Não possuem saponinas ou sapogeninas (WATSON e DALLWITZ, 2007).

As espécies da família Connaraceae nativas distribuem-se em diversos ecossistemas, principalmente na Floresta Amazônica. No cerrado são comuns as espécies arbóreas, as quais são semelhantes às leguminosas, mas podem ser prontamente distintas pela ausência de estípulas (LORENZI e SOUZA, 2005). No cerrado a família é representada por sete espécies arbustivo-arbóreas distribuídas entre os gêneros *Rourea* e *Connarus* (LENZA *et al.*, 2008).

A Figura 2 mostra a distribuição geográfica da família Connaraceae no mundo, na qual se pode perceber que ela está muito presente na América do Sul e na África.

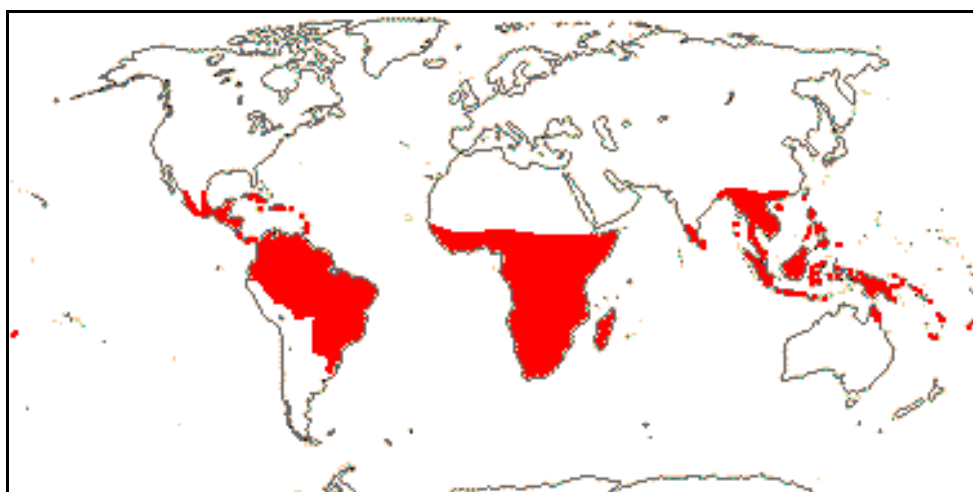


Figura 2 – Apresentação Geográfica da Família Connaraceae
Fonte: Missouri Botanical Garden, 2008

3.2.1.1 Gênero *Rourea*

Segundo Forero¹ (1976), citado por Fonseca e Proença (2002) o gênero *Rourea* é pantropical e compreende 42 espécies e 19 variedades, com centro de

¹ FORERO, H. A revision of american species of *Rourea* Subg. *Rourea* (Connaraceae). **Mem New York Bot Garden**, v.26, n.1, p.1-119, 1976.

dispersão na Amazônia. Atualmente sabe-se que este gênero abrange cerca de mais de 80 espécies (BRITANNICA, 2009).

A espécie *Rourea induta* Planch, também conhecida como campeira, botica-inteira ou pau-de-porco (figura 3 e 4), é caracterizada por arvoretas ou arbustos de até 4 metros de altura. Possui ramos jovens densamente vilosos e esverdeados, suas folhas são também densamente vilosas e perpendiculares ao ramo (FONSECA e PROENÇA, 2002). A morfologia floral é simples, as flores são pálido-amareladas, curtas, pequenas e planas, com verticilos reprodutivos e geralmente pouco expostos aos agentes polinizadores (LENZA *et al.*, 2008). Ela floresce de maio a setembro e frutifica de setembro a dezembro. Está distribuída no Brasil pelos estados do Maranhão, Bahia, Ceará, Pernambuco, Minas Gerais, Mato Grosso, Distrito Federal, e São Paulo. É abundante em áreas de cerrado campo sujo e cerrado *sensu stricto* (FORERO, 1976, citado por FONSECA e PROENÇA, 2002).



Figura 3 – Foto *Rourea induta*, Connaraceae
Fonte: SASAKI e MELLO-SILVA, 2009



Figura 4 – Prancha Botânica *Rourea induta*
Fonte: FLORA Brasiliensis, A Obra (2007)

A classificação taxonômica da espécie *Rourea induta* é apresentada no Quadro 1.

Quadro 1 – Classificação Taxonômica

	Rede de Sementes do Cerrado (2006)	Cronquist (1968)
Reino	Plantae	Plantae
Superdivisão	Spermatophyta	
Divisão	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida	Magnoliatae
Subclasse	Rosidae	Rosidae
Ordem	Rosales	Sapindales
Família	Connaraceae	Connaraceae
Gênero	Rourea	Rourea
Espécie	Induta	Induta
Gênero espécie	<i>Rourea induta</i>	<i>Rourea induta</i>
Varição	<i>induta</i>	<i>induta</i>

3.2.2 Atividades Biológicas da Família

Economicamente há poucas espécies importantes, as cascas de *Rourea glabra*, quando utilizadas em curtumes, produzem uma cor púrpura brilhante na pele dos animais. Algumas frutas, sementes e folhas de várias espécies, como *Rourea volubilis*, *Rourea glabra* e *Cnestis polyphylla*, são venenosas e são usadas, entre tantas coisas, na ponta de lanças contra cães selvagens e coiotes (BRITANNICA, 2009).

Algumas espécies possuem propriedades que possibilitam seu uso na medicina popular; em Madagascar as folhas de *Agelaea emetica* são usadas para induzir o vômito, e *Agelaea lamarckii* é um agente contra gonorrhea; no oeste da África as folhas de *Agelaea villosa* são utilizadas no tratamento para disenterias (BRITANNICA, 2009). Com relação à espécie *Rourea induta*, sabe-se que a sua cortiça é usada para tratamento de reumatismo (FONSECA e PROENÇA, 2002).

Vários estudos estão sendo realizados com espécies da família Connaraceae, dentre eles está a espécie *Rourea minor*, a qual vem sendo utilizada na medicina chinesa para o tratamento de abrasões e lesões. Estudos fitoquímicos reportam que ela possui terpenos, esteróides, quinonas, flavanas, flavonas, antracenodionas e ácidos graxos (HE *et al.*, 2006).

Estudos recentes com *R. minor* demonstraram que a fração solúvel clorofórmica apresentou *in vitro* efeito contra o *Plasmodium falciparum*. Testes com extrato clorofórmico, com extração repetida em cromatografia de coluna em sílica gel, seguido de Sephadex LH-20 e coluna cromatográfica RP-18, demonstraram a presença de dois novos compostos rourinosideo e rouremina (figura 5), além de cinco compostos já conhecidos. Os compostos novos foram testados contra o *Plasmodium falciparum*, utilizando quinina, cloroquina e artemisina como controles positivos. Os resultados mostraram uma atividade antimalárica satisfatória, e os compostos rourinosideo e rouremina podem ser classificados como ligninas ou neoligninas (HE *et al.*, 2006).

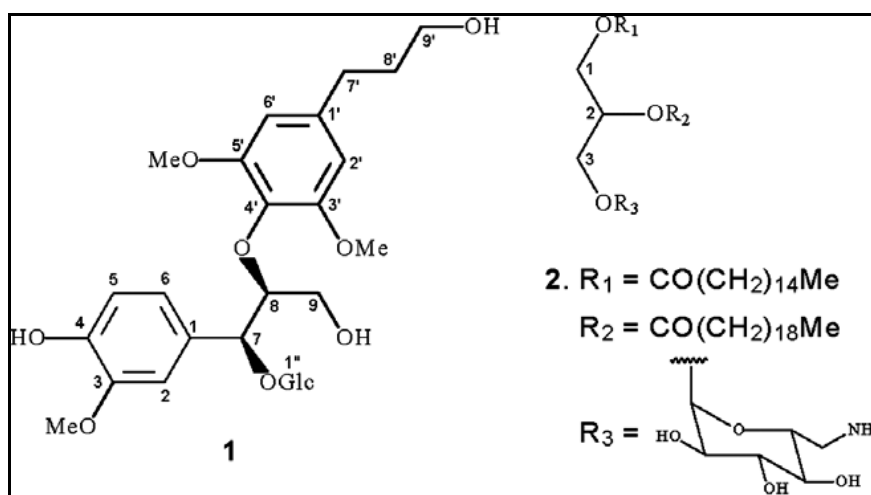


Figura 5 – Estrutura Química do Rourinosideo (1) e Rouremina (2)
 Fonte: HE *et al.*, 2006

Outra espécie que está sendo estudada é a *Agelaea pentagyna* (Lam.) Baill. O aumento do número de dermatites e alergias a pólen se tornou um problema sério no Japão, o que levou ao aumento da procura por novas substâncias de origem natural com atividade antihistamínica. O extrato metanólico de folhas de *Agelaea pentagyna* (Lam.) Baill, Connaraceae, apresentou uma grande atividade antihistamínica. Esta atividade foi atribuída ao flavonóide tricina isolado deste extrato (Kuwabara *et al.*, 2003).

A atividade antihistamínica da tricina foi testada comparativamente com alguns flavonóides naturais e sintéticos, e compostos contendo o anel catecol, o qual se acredita ser essencial para tal atividade. O extrato metanólico apresentou 100% e 49% de atividade na exocitose dos grânulos dos basófilos causada por estimulação

induzida por antígeno, nas concentrações de 1 e 0,1mg/mL respectivamente. Na partição de solventes a atividade se distribuiu nas frações com níveis variáveis. Por fim não foi possível concluir uma regra geral para essa atividade, somente a conclusão tentativa de que a tricina é a 5,7-diidroxiflavona com máxima atividade (KUWABARA *et al.*, 2003).

A espécie *Byrsocarpus coccineus* (sin. *Rourea coccínea*), Connaraceae, é uma planta ornamental utilizada para tratamento de várias doenças ao redor do oeste tropical da África. A raiz e outras partes são utilizadas para tratamento de tumores, dores de ouvido, dores musculares e reumáticas. O extrato aquoso das folhas foi estudado inicialmente por possuir atividades analgésicas, e o estudo evoluiu para avaliação de atividade antiinflamatória deste extrato usando vários modelos de inflamação. A injeção de extrato aquoso, uma hora antes da injeção de carragena e albumina, causou uma significativa diminuição dose dependente do edema em modelos animais (AKINDELE e ADEYEMI, 2007a). Segundo Bero *et al.* (2009) esta atividade antiinflamatória pode explicar o uso desta espécie no tratamento de sintomas de malária em Benin, uma vez que em testes contra *Plasmodium falciparum* nenhum extrato da espécie demonstrou uma boa atividade.

Baseado nos resultados satisfatórios para atividade analgésica e antiinflamatória, o estudo avançou para a avaliação da atividade antipirética do extrato. Em três modelos de hipertermia testados o extrato apresentou uma redução significativa da temperatura corporal dos animais testes, chegando a se igualar ao efeito do ácido acetilsalicílico. Quando em concentração de 400mg/Kg ocorreu uma redução de 63,64% da temperatura (AKINDELE e ADEYEMI, 2007b).

Esta espécie parece apresentar também uma atividade antidiarréica, segundo estudo baseado no uso de decocção ou macerado em água fria das folhas dessa planta para o alívio de diarreia. Essa ação foi testada através de experiência em ratos com administração oral do decocto em água destilada. Foi provado que o extrato de *Byrsocarpus coccineus* promove uma diminuição dose dependente do trânsito intestinal. A maior inibição ocorreu com uma dose de 400mg/kg, mas ainda é um efeito menor do que o produzido pela morfina em uma dose de 10mg/kg (AKINDELE e ADEYEMI, 2006).

A análise fitoquímica preliminar da espécie mostrou a presença de alcalóides, taninos, saponinas, açúcares redutores, glicosídeos e antraquinonas (AKINDELE e ADEYEMI, 2006).

3.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

3.3.1 Flavonóides

Os flavonóides são os compostos comuns na maioria das espécies da família Connaraceae. São compostos do metabolismo secundário das plantas que derivam da condensação de uma molécula do ácido cinâmico com três grupos malonil-CoA. São também denominados pigmentos naturais, e desempenham um papel fundamental de proteção do vegetal contra agentes oxidantes, como raios ultravioleta e poluição (SILVA, 2008; SASAKI, 2008).

São compostos de baixo peso molecular com uma estrutura base de 15 carbonos, esqueleto defenilpropano, composta por dois anéis fenólicos (A e B) ligados por um anel pirano (C) (figura 6) (BEHLING *et al*, 2004) .

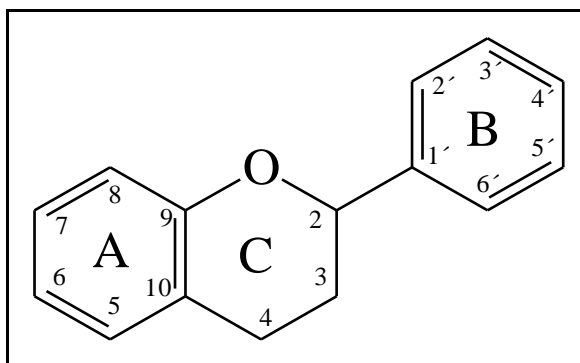


Figura 6 – Estrutura Básica de Flavonóides

Dependendo da substituição e do nível de oxidação do anel pirano os flavonóides podem ser divididos em diversas classes:

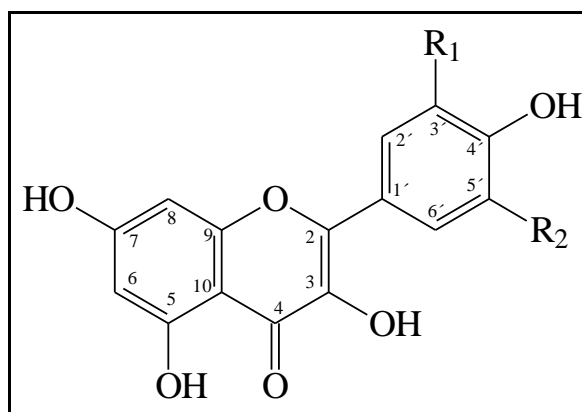
- Flavanois: hidroxila na posição 3, ex. catequina e epicatequina.
- Flavonois: carbonila na posição 4, hidroxila em 3 e uma ligação dupla entre 2 e 3, ex: quercetina e canferol.
- Flavonas: carbonila na posição 4 e uma ligação dupla entre 2 e 3, ex: rutina e apigenina.

- Antocianidinas: hidroxila na posição 3, e ligação dupla entre o oxigênio e o carbono 2, e entre os carbonos 3 e 4, ex: cianidina.
- Isoflavonoides: carbonila na posição 4 e o anel B está ligado ao restante da molécula pelo carbono 3, ex: genisteína.
- Flavononas: carbonila na posição 4, ex: miricetina e naringenina.

Além dessas classes há as chalconas, auronas, diidrochalconas, flavandiol, bioflavonóides e protoantocianidinas.

Os flavonóides podem ocorrer como agliconas, porém freqüentemente ocorrem como glicosídeos, e dentro de uma mesma classe podem diferir entre si de acordo com o padrão de substituição do glicosídeo nos anéis A e B, que podem se ligar a molécula em C-3 ou C-7, sendo a primeira mais comum (SILVA, 2008).

Na medicina humana os flavonóides são utilizados como agentes antimicribianos, inseticidas, inibidores de enzimas, antioxidantes, entre outros. Possuem grande atividade antioxidante, pois tem uma grande capacidade de seqüestrar radicais livres e quelar íons metálicos, atividade que é aumentada quando a molécula possui dois grupos hidroxila em orto no anel B, uma dupla conjugada com a carbonila na posição 4 e hidroxilas em 3 e 5. Dessa maneira o flavonóide miricetina é o que apresenta uma maior ação antioxidante, seguido da quercetina (figura 7). A quercetina possui uma capacidade antioxidante cinco vezes maior do que as vitaminas C e E, e quando atua junto com a vitamina C ocorre uma redução deste flavonóide, de maneira que a combinação com a vitamina C permite que o flavonóide exerça por mais tempo suas funções antioxidantes (SILVA, 2008; SASAKI, 2008).



Legenda: Miricetina R1 = OH R2 = OH Quercetina R1 = OH R2 = H

Figura 7 – Estrutura da Miricetina e Quercetina

Muitas das ações biológicas dos flavonóides podem ser atribuídas a sua propriedade antioxidante, como a proteção dos tecidos contra radicais livres e peroxidação lipídica. Os flavonóides fazem a neutralização dos radicais hidroxil e ânion superóxido, que são espécies altamente reativas que iniciam a peroxidação lipídica envolvida no dano tecidual. Dentre as propriedades terapêuticas atribuídas aos flavonóides estão: proteção contra processos cancerígenos, doenças cardiovasculares e proteção do fígado e rins (BEHLING *et al.*, 2004).

4 METODOLOGIA DA PESQUISA

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

As amostras de folhas de *Rourea induta* Planch, Connaraceae, foram coletadas pelo Sr. Enio Jonas Karkle, na cidade de Rondonópolis, Mato Grosso, no mês de novembro de 2007, época próxima da formação dos frutos. As folhas foram secas à sombra.

A exsicata da espécie *Rourea induta* está registrada no Museu Botânico de Curitiba pelo número 261574.

4.2 ENSAIO PARA ANÁLISE FITOQUÍMICA

Os ensaios fitoquímicos preliminares são de fundamental importância quando não se possui estudos químicos sobre a espécie em estudo. Para realização destes testes foi utilizada a metodologia desenvolvida por Moreira (1979), com adaptações, que consta das etapas abaixo descritas.

4.2.1 Metabólitos Solúveis em Álcool

O extrato hidroalcoólico a 20% foi preparado por maceração de 40g de material vegetal seco e estabilizado em 200mL de álcool etílico a 70% v/v, em banho maria a 70°C por 1 hora, o qual foi ser filtrado em papel de filtro e completado o volume para 200mL. Depois o extrato foi concentrado até um terço do seu volume e particionado com solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila, em funil de separação. Para cada fração foram utilizados 20mL do extrato e o volume completado para 200mL com o próprio solvente. O resíduo do extrato

constituiu a fração hidroalcoólica remanescente, tendo seu volume completado para 200mL com etanol.

As quatro frações obtidas foram usadas para a pesquisa dos seguintes grupos fitoquímicos: glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, aminogrupos, glicosídeos cumarínicos e glicosídeos antraquinônicos.

4.2.1.1 Pesquisa de alcalóides

A pesquisa qualitativa de alcalóides foi feita com os reativos conhecidos como reativos gerais de alcalóides: mercúrio tetraiodeto de potássio (Reativo de Mayer), tetraiodeto bismuto de potássio (Reativo de Dragendorff), ácido sílico túngico (Reativo de Bertrand), p-dimetilamino benzaldeído (Reativo de Ehrlich) e Reativo de Vitali-Morin (promove a nitração de alcalóides).

De cada fração foi retirada uma amostra de 50mL, a qual foi evaporada em banho-maria a 50°C. Dissolveu-se o resíduo em 1mL de etanol e acrescentou-se 20mL de HCl 1%. Para cada amostra testada foram feitos 5 tubos de ensaio, cada um com 1mL do respectivo extrato clorídrico, para cada tubo adicionou-se duas gotas de um reativo.

Considera-se positiva a presença de alcalóides na amostra com as seguintes visualizações para os reativos:

- ✧ Mayer: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.
- ✧ Dragendorff: formação de precipitado de coloração tijolo.
- ✧ Bouchardat: formação de precipitado de coloração alaranjada.
- ✧ Bertrand: formação de precipitado branco ou leve turvação branca.

Para cada amostra, utilizou-se um tubo somente com o extrato, que serviu como controle negativo.

4.2.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Foram levados a secura 10mL das frações e depois dissolvidos com 5mL de álcool etílico. Posteriormente adicionaram-se 5 gotas de HCl concentrado, levando ao aquecimento até ebulição. A reação é positiva quando há desenvolvimento de coloração vermelha.

4.2.1.3 Pesquisa de heterosídeo flavônico

Cada fração teve 20mL levados à secura e dissolvidos posteriormente com 10mL de etanol. Dessas frações 5mL foram transferidos para cada tubo de ensaio, a fração hidroalcoólica não passou pela secura, foi transferida diretamente ao tubo de ensaio. Em cada tubo foram adicionados 200mg de limalha de ferro e HCl fumegante lentamente. O resultado positivo é observado quando ocorre o desenvolvimento de coloração vermelho a vermelho sangue.

4.2.1.4 Pesquisa de flavonóis

Esta pesquisa é realizada pelo teste do Oxálico Bórico ou reação de Taubock. Para tal, 10mL de cada fração foram levados à secura, depois adicionadas 5 gotas de acetona e 30mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1), levando novamente a secura, a este resíduo foram adicionados 5mL de éter etílico. A visualização foi realizada em ultravioleta, se houver fluorescência a reação é considerada positiva.

4.2.1.5 Pesquisa de dihidroflavonois

Em cápsulas de porcelana adicionou-se 10mL de cada fração, os quais foram levados à secura. O resíduo foi aquecido em fogareiro com alguns cristais de

acetato de sódio, 0,1mL de anidrido acético e 0,1mL de HCl concentrado. O desenvolvimento de coloração roxa é positiva.

4.2.1.6 Pesquisa de cumarinas

Para a pesquisa de cumarinas concentrou-se as frações até 5mL em banho-maria, através da secura de 30mL a 50°C, e recuperação com acetato de etila (5mL). A fração hidroalcoólica foi levada até pH 1 por adição de HCl 2N e 5mL de HCl concentrado. Esta mistura foi resfriada e transferida para um funil de separação para extração com éter etílico (2 X 10mL). Essa frações foram reunidas e concentradas em banho-maria até 5mL.

Das frações obtidas transferiu-se 3mL para tubos de ensaio, onde adicionaram-se 2mL de NaOH 2N. Os tubos foram levados para a câmara de luz ultravioleta em 366nm por 15 minutos. Para reação positiva é observada fluorescência azul ou verde amarelada.

Paralelamente, com o restante dos extratos etéreos, foram marcados, em um papel de filtro, três pontos com manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro. As manchas 1 e 2 foram tratadas com NaOH 1N e, sobre a mancha 1, colocou-se uma moeda, depois foram levadas à câmara de ultravioleta a 365nm, novamente deixando em exposição por 15 minutos. A reação é tida como positiva com o desenvolvimento de fluorescência, com coloração azul ou verde amarelada na mancha 2.

4.2.1.7 Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Em balões de fundo chato foram transferidos 30mL das frações junto com 5mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. A mistura foi deixada em refluxo por uma hora, e posteriormente filtrada, adicionando-se, em seguida, 30mL de H₂O. Transferiu-se para um funil de separação, para extração com éter (2 X 10mL). As frações obtidas foram reunidas e concentradas em banho-maria, até um volume de

5mL, e colocadas em um tubo de ensaio, adicionando-se 5mL de NH_4OH (Reação de Borntraeger). A reação é considerada positiva com observação de coloração vermelha.

4.2.1.8 Pesquisa de esteróides e triterpenos

As frações (10mL) foram evaporadas até secura e os resíduos redissolvidos em 5mL de clorofórmio e filtrados em algodão. De cada uma das amostras 0,1; 0,5 e 1,0mL foram transferidos para três tubos de ensaio, e o volume completado para 2mL com clorofórmio.

*Reação de Liberman-Bouchard

Para essa reação, foi adicionado aos tubos de ensaio 1mL de anidrido acético e lentamente 2mL de H_2SO_4 concentrado.

A coloração indica:

- Rósea ou azul: presença de função carbonila na posição 3 e duplo enlace nas posições 5 e 6 ou 7 e 8.
- Verde: função hidroxila em 3 e dupla ligação entre 5 e 6 ou 7 e 8.
- Amarela: grupamento metila no carbono 14.

*Reação de Keller Kelliani

Levou-se à secura 2mL dos extratos clorofórmicos preparados anteriormente. Os resíduos foram dissolvidos com 2mL de ácido acético glacial e 0,2mL de solução aquosa de cloreto férrico 1%. Transferiram-se então as misturas para tubos de ensaio contendo 2mL de H_2SO_4 .

O desenvolvimento de coloração azul ou verde na zona de contato entre as duas fases indica a presença de desoxiaçúcares, sendo:

- azul: esteróides;
- verde: triterpenos.

4.2.2 Metabólitos Solúveis em Água

O extrato aquoso foi preparado com 40g do vegetal e 200mL de água em banho-maria por 1 h à 70°C. Depois o material foi filtrado e completado o volume com água até 200mL. Nesse extrato pesquisaram-se os seguintes grupos fitoquímicos: glicosídeos antociânicos, saponinas, glicosídeos cianogenéticos taninos condensados e hidrolisáveis, aminogrupos e flavonóides.

4.2.2.1 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Foram separados 5mL do extrato em 3 tubos de ensaio. No primeiro colocou-se HCl 1% até pH 4, se aparecerem tons avermelhados a reação é positiva; o segundo foi alcalinizado com NaOH até pH 10, e se positivo observa-se tons azulados; e o terceiro foi neutralizado a pH 7 com o aparecimento de tons violáceos.

Depois 10mL do extrato foram extraídos com álcool butílico em funil de separação por duas vezes. Reuniu-se as duas frações obtidas em uma cápsula de porcelana e concentradas até 5mL. Foram adicionadas 5 gotas de HCl concentrado e aquecidos até ebulição. O desenvolvimento de coloração vermelha indica a presença de antocianidina.

4.2.2.2 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Para esse teste foram utilizados 3 tubos de ensaio com a mesma quantidade de extrato, esses foram agitados energeticamente por cinco minutos medindo em seguida a espuma formada. Após repouso de 30 minutos, a presença de saponinas é confirmada pela formação de espuma persistente com altura superior a 1cm.

4.2.2.3 Pesquisa de heterosídeos cianogênicos

A um tubo de ensaio, foram adicionados 5mL do extrato aquoso, de modo a não umedecer as paredes do tubo, e 1ml de H_2SO_4 10% ou 1N. Suspendeu-se uma tira de papel picro-sódico, com o auxílio de uma rolha de cortiça, mantendo em banho-maria (60°C) por 30 minutos. O resultado positivo para heterosídeos cianogênicos é observado pelo desenvolvimento de coloração marrom a vermelho no papel picro-sódico.

Para preparar o papel picro-sódico tiras de papel de filtro com 1cm de largura são embebidas em solução de ácido pícrico 1% e secas ao abrigo da luz. As tiras pícricas secas são embebidas em solução de carbonato de sódio 10%, secas e armazenadas em frasco âmbar.

4.2.2.4 Pesquisa de taninos

Transferiu-se 1mL de extrato aquoso para cinco tubos de ensaio e adicionaram-se os seguintes reagentes:

Tubo 1: 3 gotas de cloreto férrico. Coloração azul ou verde, com formação ou não de precipitado – resultado positivo para taninos.

Tubo 2: 1 a 3 gotas de sulfato amoniacal. Coloração azul ou verde – resultado positivo.

Tubo 3: 1 a 3 gotas de cloridrato de emetina. Formação de precipitado – resultado positivo.

Tubo 4: 5mL de ácido acético (gota a gota) e 5mL de acetato de chumbo. Presença de precipitado – resultado positivo.

Tubo 5: 3 gotas de dicromato de potássio 1%. Desenvolvimento de precipitado – resultado positivo.

Para a pesquisa de taninos condensados e hidrolisáveis foram transferidos 30mL do extrato para um balão de fundo chato junto com 6mL de formaldeído 40% e 4mL de ácido clorídrico 37%. Essa mistura foi aquecida em refluxo por uma hora, e depois de frio filtrado. O resíduo do papel de filtro foi lavado com solução de álcool 50% e gotejadas algumas gotas de KOH a 5%. A coloração verde indica a presença de taninos condensados. Ao filtrado adicionou-se excesso de acetato de sódio e gotas de solução aquosa de cloreto férrico 1%, a coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.2.2.5 Pesquisa de ácidos voláteis

Esse teste foi realizado da mesma maneira do que o teste para heterosídeos cianogénéticos com uma fita de pH. A presença desses ácidos é indicada pela coloração da fita para valores abaixo de pH 7.

4.2.2.6 Pesquisa de ácidos fixos

Em um balão, foram adicionados 20mL do extrato aquoso e 2ml de NaOH 1N, que permaneceram em refluxo por 30 minutos. Após resfriamento, acidificou-se com H_2SO_4 2N e extraiu-se com éter etílico (3 porções de 10mL). Os extratos etéreos foram reunidos e tratados com carvão ativo, sendo em seguida filtrados e evaporados em banho-maria (50°C) até a secura. O resíduo foi deixado em estufa por 10 minutos, resfriado e adicionados 5mL de NH_4OH 1N. Em uma tira de papel de filtro concentraram-se duas manchas (3 gotas em cada mancha) com o resíduo amoniacal, deixando na estufa até secar, e sobre uma das manchas foi gotejado o reativo de Nessler. A coloração marrom nessa mancha indica a presença de ácidos fixos. Os ácidos fórmico, propiônico e aminoacético não formam manchas, pois não fixam a amônia, apresentando reação negativa.

4.2.2.7 Pesquisa de amino grupo

Nesse teste 10mL do extrato aquoso foram concentrados até 5mL a temperatura de 60°C. Em uma cromatoplaça de CCD depositou-se 3 gotas desse extrato concentrado, e após secas sobre uma das manchas foi colocado uma gota de ninhidrina. A placa foi aquecida em estufa por 15 min com temperatura de 90-100°C. A coloração azul-violácea indica a presença de aminogrupos.

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO E DAS FRAÇÕES

O extrato bruto foi obtido a partir de 2kg do material vegetal em etanol, com a utilização do aparelho de Soxhlet. Este foi concentrado em evaporador rotativo até 300mL e filtrado. O extrato bruto foi usado para a obtenção das frações por partição líquido/líquido com solventes de diferentes polaridades, na seguinte ordem: n-hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração hexano foi reunida ao resíduo do filtrado e fracionado por coluna de sílica em Soxhlet com hexano para uma purificação prévia obtendo-se duas frações.

4.4 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS

As frações obtidas do extrato foram passadas em coluna cromatográfica com fase estacionária sílica gel 60 Merck 0,063 – 0,200mm, e fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. A pastilha a ser cromatografada foi preparada com sílica gel 60 na proporção de 5 partes em relação a quantidade de amostra e levada à secar em banho-maria a 50°C, sob constante homogeneização.

Em uma coluna de vidro, preparou-se a sílica-gel a ser depositada na proporção de 5 partes em relação à quantidade de pastilha. O sistema eluente

iniciou com 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5%, até 100% de acetato de etila, a partir deste foi utilizado metanol como gradiente, com variação de 5%.

As amostras recolhidas foram levadas a secar na temperatura ambiente para cristalização dos compostos, depois essas amostras foram resuspendidas e filtradas à vácuo para se obter os cristais. Esses cristais foram identificados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) ^{13}C e ^1H , ultravioleta, infravermelho e ponto de fusão.

Para RMN de ^{13}C e ^1H utilizou-se espectrofotômetro Brucker® modelo AC200 em 300 MHz, realizada no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. A espectroscopia no ultravioleta foi realizada em espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® de 200 a 450 nm de acordo com a metodologia de Mabry, Markham e Thomas (1970). Para infravermelho as amostras foram preparadas em pastilhas de brometo de potássio anidro (KBr) comprimidas em equipamento Bomem-Hartmann & Braum MB-serie e analisadas em aparelho Bioered® FTS 3500 GX entre 400 e 4000 cm^{-1} . O ponto de fusão foi medido em aparelho de Koffler-Reichert Áustria.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Ensaio da Redução do Complexo Fosfomolibdênio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio, descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), é uma maneira simples e barata de se avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos, como é o caso de extratos obtidos de plantas, bem como suas frações. Possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos.

O complexo fosfomolibdênico é formado pela reação da solução de Na_3PO_4 (28mL, 0,1mol/L) com solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (12mL, 0,03mol/L) e solução de H_2SO_4 (20mL, 3mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com H_2O

destilada para 100mL, e possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz (PRIETO, PINEDA E AGUILAR, 1999)

As amostras (frações e substâncias M1 e M5) foram levadas à secura em banho-maria (40°C), e a partir do material seco, bem como das substâncias isoladas foram preparadas soluções metanólicas com concentração final de 200µg/mL. Destas, 0,3mL foram adicionados à 3mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C por 90 min. Após resfriamento, foi feita a leitura a 695nm, em um espectrofotômetro UV-1601 Shimadzu® para obtenção das absorbâncias, usando 0,3mL de metanol com 3mL do reagente como branco. A capacidade antioxidante das amostras é expressa em relação à rutina (200µg/mL) usada como padrão, e vitamina C (200µg/mL) cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 1,00.

4.5.2 Potencial Antioxidante por Cromatografia de Camada Delgada

De acordo com o método descrito por Conforti *et al.* (2002), as amostras das frações, das substâncias M1 e M5, e os padrões (10mg/ml) foram submetidos à cromatografia em camada delgada (CCD), usando como fase móvel a mistura acetato de etila, acetona e água (25:8:2). Em seguida, as placas foram reveladas com solução a 0,2% (p/v) de DPPH em etanol, o desenvolvimento de coloração amarela nas manchas revelou reação positiva.

4.5.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre e estável (figura 8) com o qual compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem, permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre

reduzindo-o. É um método fácil, rápido e muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de amostras vegetais.

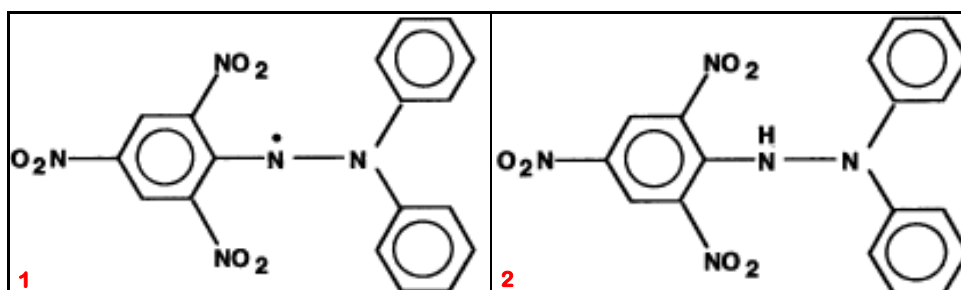


Figura 8 – Estrutura Química do Difenilpicrilhidrazila - Radical Livre (1), e Difenilpicrilhidrazine – Radical Reduzido(2)

Fonte: MOLYNEUX, 2004

O potencial de redução do radical DPPH das amostras (frações e substância M5) foi analisado espectrofotometricamente segundo Mensor *et al.*(2001). Foram preparadas cinco soluções metanólicas das frações nas concentrações de 2,0 a 12,5µg/mL, das quais 2,5mL foram adicionados a 1mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Para as frações hexano foram utilizadas cinco soluções com concentrações entre 100 e 300µg/mL. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5mL da solução e 1mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi feito um controle com 2,5mL de metanol e 1mL de DPPH. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518nm, correspondente a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina e vitamina C.

A habilidade dos extratos em reduzir o radical foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição do DPPH} = 100 - \left\{ \frac{(A \text{ amostra} - A \text{ branco})}{A \text{ controle}} \times 100 \right\}$$

4.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, segundo Meyer *et al.* (1982), é um ensaio biológico rápido, de baixo custo, não requer ambiente asséptico, utiliza um grande número de organismos para validação estatística, não requer equipamentos especiais e a quantidade de amostra é relativamente pequena (2-20mg) (MEYER *et al.*, 1982; DALL'STELLA, 2008).

4.6.1 Preparo da Solução Salina

A água do mar artificial foi preparada com 38g de sal marinho (23g NaCl, 11g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 4g Na_2SO_4 , 1,3g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ou $CaCl_2 \cdot 6H_2O$, 0,7g KCl) e 1000mL de água purificada.

O pH foi ajustado para 9,0 com Na_2CO_3 para evitar o risco de morte das larvas por diminuição do pH durante a incubação. Segundo Lewan *et al.* (1992), um pH superior a 6 é essencial para o desenvolvimento de *Artemia Salina*, e um pH superior a 10,5 deve ser evitado.

4.6.2 Eclosão dos Ovos

Os ovos de *Artemia salina* (200mg/400mL) foram colocados na água salgada para eclodir por 48 horas sob aeração contínua e expostos à luz diurna. A temperatura foi controlada entre 27 e 30°C e o pH entre 8-9. Na primeira hora do processo foi mantida iluminação (20W) sobre o recipiente.

4.6.3 Preparo das Amostras

O estudo foi realizado com as frações e as substâncias isoladas M1 e M5. As amostras foram levadas à secura em banho-maria (40°C), pesadas aproximadamente 20mg e adicionados solvente em quantidade suficiente para obter a concentração inicial da solução de 10mg/mL.

Como solventes foram utilizados metanol para as frações solúveis e clorofórmio para a fração hexano 1 e para a substância M1, que não são solúveis no metanol.

Desta solução 2,5, 25 e 250µL foram transferidos com pipeta automática para tubos de ensaio correspondendo respectivamente a 10, 100 e 1000µg/mL, em triplicata. O solvente foi evaporado por 12 horas (DALL'STELLA, 2008).

4.6.4 Avaliação da Toxicidade

Após a eclosão dos ovos, 10 larvas de *Artemia salina* foram transferidas para cada tubo de ensaio contendo as frações e para os tubos controles. Os controles negativos consistiram de tubos com o solvente solubilizador da fração, os quais foram evaporados juntamente com as amostras. Como controle positivo foi utilizado sulfato de quinidina. O volume de todos os tubos foi ajustado com água do mar artificial para 2,5mL.

Após 24 horas, foi realizada a contagem das larvas mortas e vivas com auxílio de lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados com o método estatístico Probitos e determinados os valores de DL₅₀ e 95% de intervalos de confiança. As frações foram consideradas ativas quando DL₅₀ foi menor que 1000 ppm (MEYER *et al.*, 1982).

4.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ALELOPÁTICA

O estudo alelopático procura determinar o efeito de uma planta doadora sobre uma planta receptora, ou seja, o efeito de um indivíduo sobre outro prejudicando ou favorecendo (MALHEIROS E PERES, 2001).

O ensaio realizado de acordo com Malheiros e Peres (2001), e Dias (2005) foi preparado em caixas Gerbox colocadas no germinador Mangelsdorf (Biomatic). Para avaliação do crescimento e germinação utilizaram-se sementes de *Lactuca sativa*, classe fiscalizada, cultivar Babá, espécie amplamente citada na literatura por apresentar características apropriadas para os testes, pois são pequenas e possuem uma grande superfície de contato fazendo com que sejam bastante sensíveis ao meio que as rodeia (DIAS, 2005).

4.7.1 Preparo do Teste

Foram testadas as frações e duas substâncias isoladas (M1 e M5). As amostras foram diluídas em metanol de forma a se obter 0,8; 0,4; 0,2 e 0,1mg em 2mL de metanol, a partir de uma solução mãe de 1mg/mL. Todas foram preparadas em duplicata. As amostras da fração hexano 1 e da substância M1 foram diluídas em clorofórmio.

As caixas Gerbox foram previamente lavadas, passadas em solução de hipoclorito diluída e enxaguadas com água. Embeberam-se as amostras em pedaços de papel de filtro Whatman número 6, os quais foram levados à estufa e mantidos a 40°C, durante 24 horas, para evaporação total do solvente. Paralelamente, em cada caixa Gerbox utilizada, um pedaço de papel de filtro isento de amostra foi inserido, com a finalidade de manter as condições de umidade do ambiente. Após 24 horas, cada papel de filtro embebido com a amostra na sua respectiva concentração, foi posicionado nas caixas Gerbox, às quais foi adicionado 3mL de água destilada e distribuídas 20 sementes em 4 repetições consecutivas de 5 sementes para cada caixa (DIAS, 2005; BALESTRIN, 2006).

Foram utilizados controles de caixas apenas com água destilada e sementes, e caixas com solvente (metanol ou clorofórmio), água destilada e sementes, nas mesmas condições do experimento. O papel filtro com solvente também foi levado à estufa para evaporação juntamente com as amostras.

O material preparado e os controles ficaram protegidos da luz com papel alumínio e colocados em germinador Mangelsdorf (Biomatic), com limites de temperatura entre 17 e 20°C. Para cada concentração prepararam-se duas caixas, uma para o estudo da germinação e outra para o estudo do crescimento.

4.7.2 Teste de Germinação

Durante a germinação fez-se leituras diárias por sete dias, no mesmo horário, e dentro do fluxo laminar. As sementes que germinaram foram retiradas da caixa diariamente. As sementes foram consideradas germinadas quando se tornou visível a protrusão da radícula através do tegumento.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado para cada repetição de cada tratamento. Este índice é calculado utilizando-se a quantidade de sementes germinadas, dividindo-se pelo dia da germinação e somando-se até o último dia de germinação. As médias dos índices de velocidade de germinação foram submetidas ao Teste de Scott-Knott.

4.7.3 Teste de Crescimento

A leitura do crescimento foi realizada com o material que foi mantido no germinador por sete dias, os quais foram abertos somente no dia da leitura, último dia do teste. Para cada semente mediu-se, com auxílio de papel milimetrado, o tamanho da radícula, que posteriormente origina a raiz, e do hipocótilo, que origina o caule.

Os resultados foram submetidos ao teste de Scott-Knott para comparação das médias.

4.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.8.1 Difusão em Ágar

O método de difusão em gel, adaptado de Romeiro (2001), foi utilizado para determinar a atividade antibacteriana das frações e substâncias isoladas, buscando-se encontrar alguma atividade inibitória do desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*.

Neste teste discos de papel impregnados com amostras em estudo foram adicionados a um meio específico com um microorganismo inoculado, ocorrendo difusão das substâncias impregnadas nos discos através do meio de cultura teste. A comprovação da atividade antibacteriana ocorre pela formação de um halo de inibição ao redor do disco de papel impregnado com a amostra em estudo.

4.8.1.1 Preparo das Amostras

As amostras para estudo foram obtidas a partir das frações e duas substâncias isoladas (M1 e M5). Cada amostra foi testada em duas concentrações 1000µg e 500µg, essas concentrações foram obtidas a partir de um solução inicial de 50mg/mL para cada amostra. As frações hexano 2, clorofórmio, acetato de etila e a substância M5 foram solubilizadas em metanol, e a fração hexano 1 e a substância M1 em clorofórmio (DIAS, 2005).

Este procedimento foi realizado dentro de câmara de fluxo laminar.

4.8.1.2 Preparo dos discos de papel

Espalharam-se os discos de papel em placa de petri, devidamente identificados, dentro do fluxo laminar. Para se obter a concentração de 1000µg foram impregnadas nos discos duas aplicações de 10µL da solução inicial, e para a

concentração de 500µg uma aplicação de 10µL. Prepararam-se também discos controles apenas com metanol e clorofórmio, utilizados na diluição dos extratos. As placas foram deixadas abertas para secagem das amostras impregnadas.

4.8.1.3 Meio de Cultura

O meio de cultura ágar Mueller-Hinton foi preparado de acordo com o procedimento do fabricante, esterilizado e colocado nas placas de petri previamente esterilizadas. Foi escolhido por ser um meio não enriquecido, porém suficientemente nutritivo para permitir o desenvolvimento das colônias bacterianas, é o mais utilizado para testes de bactérias aeróbicas e anaeróbicas facultativas.

4.8.1.4 Preparo do Inóculo

Foram utilizadas cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), as quais foram repicadas em caldo tríptico de soja e incubadas à 35°C, 24 horas antes do teste.

As culturas jovens de cada bactéria foram diluídas em 5mL de salina estéril comparando-se com a turbidez do tubo número 0,5 da escala de Mac Farland (0,5mL de cloreto de bário a 1% em 9,5mL de ácido sulfúrico a 1%) a fim de se obter a concentração de um milhão e quinhentos mil bactérias por mL.

Realizou-se a inoculação com auxílio de swab estéril e dentro de câmara de fluxo laminar.

4.8.1.5 Teste de atividade antibacteriana

Em cada placa inoculada foram distribuídos seis discos de papel impregnados, dois discos de cada amostra correspondentes as duas concentrações

(500 e 1000µg), além de um disco impregnado apenas com o solvente e um disco de controle positivo com cloranfenicol (30µg). Incubaram-se as placas inoculadas em estufa a 35°C, durante 24 horas. Após este período, retiraram-se as placas da estufa e mediram-se os halos de inibição, quando presentes, com auxílio de régua.

4.8.2 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima

Utilizou-se o método de diluição em caldo, adaptado de Konemann *et al.* (1993), para determinação da concentração mínima inibitória das frações do extrato e substâncias isoladas frente ao desenvolvimento de cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyphimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. As amostras foram testadas em diferentes diluições e o primeiro tubo onde não se observou crescimento bacteriano foi considerado a concentração inibitória mínima.

4.8.2.1 Preparo das amostras

As amostras a serem testadas foram diluídas em caldo caseína de soja, a partir de uma solução inicial de 4000µg/mL em água estéril, nas proporções 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64. A diluição ocorreu da seguinte forma: no primeiro tubo de ensaio estéril adicionou-se 1mL de caldo nutritivo e 1mL da solução amostra na concentração de 4000µg/mL, deste tubo foi retirado 1mL e transferido para outro tubo estéril com mais 1mL de caldo nutritivo. Efetuou-se este procedimento, dentro de câmara de fluxo laminar, sucessivamente até obtenção da proporção 1:64, totalizando sete tubos para cada amostra, em duplicata. Um tubo contendo 1mL de caldo foi separado para ser usado como controle positivo, e o controle negativo foi preparado com 1mL de extrato e 1mL de caldo.

4.8.2.2 Preparo do inóculo

As cepas de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Salmonella thyphimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) foram repicadas em caldo caseína de soja e incubadas à 35°C, 24 horas antes do teste.

Para o preparo do inóculo, as culturas jovens de cada bactéria foram diluídas na proporção de 2% em solução de Tween 80 a 2%, comparando-se com a turbidez do tubo número 0,5 da escala de Mac Farland (0,5mL de cloreto de bário a 1% em 9,5mL de ácido sulfúrico a 1% - um milhão e quinhentos mil bactérias por mL). Procedimento realizado dentro de câmara de fluxo laminar.

4.8.2.3 Teste de concentração mínima inibitória

Para cada amostra testada frente a cada microrganismo foram inoculados 1,0mL da suspensão de bactérias sobre 1,0mL de extrato diluído em caldo nutritivo nas proporções 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 e 1:64, os quais foram incubados à 35°C por 24 horas.

O tubo que representa o controle positivo, com apenas 1mL de caldo nutritivo, recebeu também 1,0mL de suspensão de bactérias, e o controle negativo não foi inoculado com microrganismos.

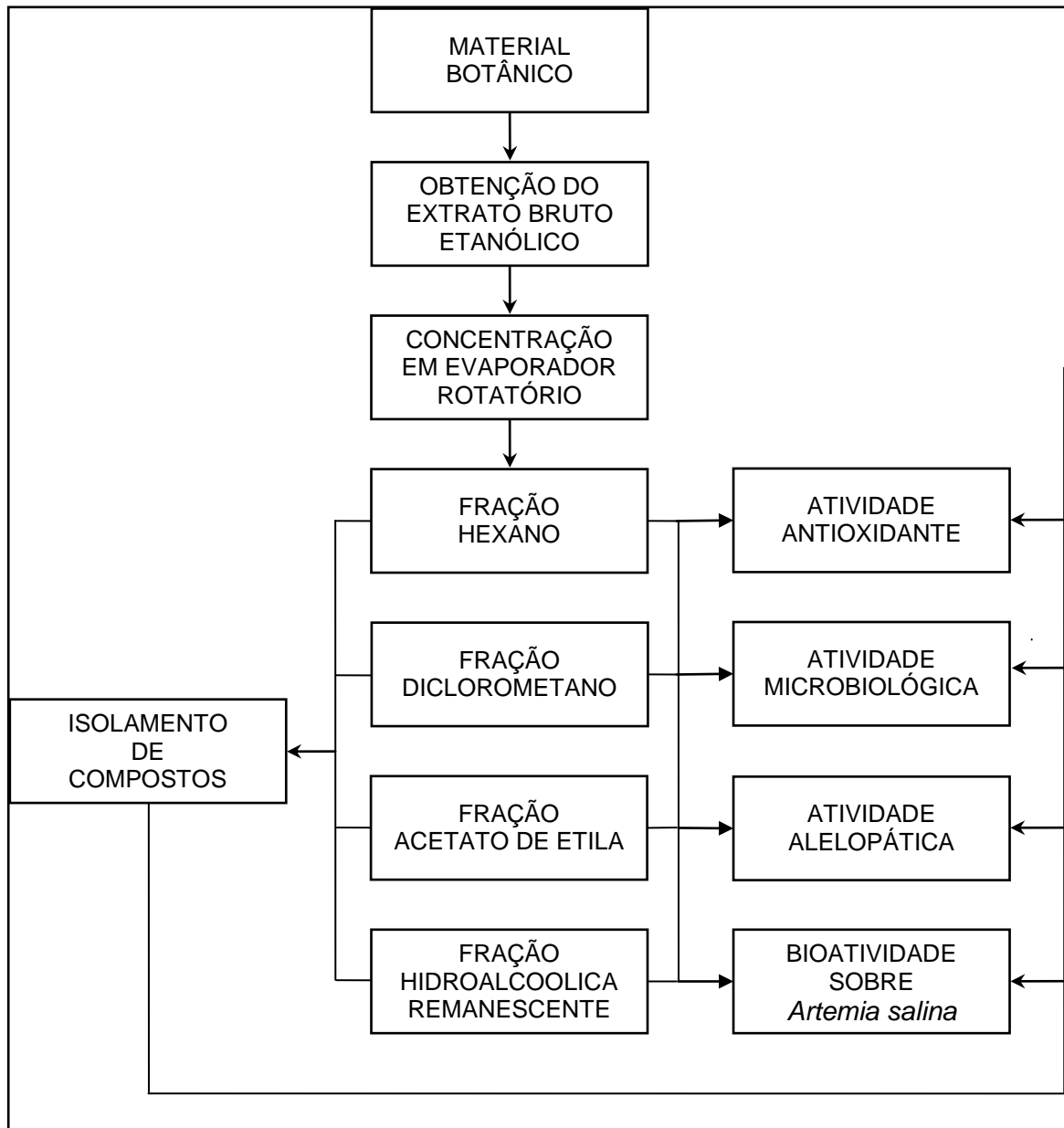
A leitura do resultado foi feita por comparação de cada tubo com os controles negativo e positivo, sendo considerado como MIC a menor concentração da amostra em que não houve crescimento bacteriano.

As concentrações finais de cada tubo estão descritas na tabela 1:

Tabela 1 – Concentração Final das Amostras no Teste CIM

Tubo	Diluição	Concentração (µg/mL)
1	1:1	1000
2	1:2	500
3	1:4	250
4	1:8	125
5	1:16	62,5
6	1:32	31,25
7	1:64	15,62

4.9 FLUXOGRAMA DA PESQUISA



5 RESULTADOS

5.1 PESQUISA DE GRUPOS FITOQUÍMICOS

Os ensaios fitoquímicos preliminares são utilizados como guias para o isolamento de substâncias, pois informam os principais grupos de metabólitos presentes na amostra. Os resultados desta análise são apresentados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Análise Sistemática do Extrato Hidroalcoólico a 20%

	Análise	Extrato hidroalcoólico	Fração hexano	Fração Acetato de etila	Fração Clorofórmio
Alcalóides	Reativo Mayer	–	–	–	–
	Reativo Dragendorff	–	–	–	–
	Reativo Bouchardat	–	–	–	–
	Reativo Bertrand	–	–	–	–
Flavonóides	Leucoantocianidinas	–	–	+	+
	Heterosídeos flavônicos	–	–	Vermelho	Amarelado
	Oxálico bórico	–	–	–	–
	Pacheco	–	–	–	–
Cumarina	Tubo	–	–	–	+
	Papel	–	–	–	+
Antraquinonas		–	–	–	–
Esteróides/triterpenos	Reação Liberman-Bouchard	–	Verde	Amarelo	Amarelo
	Reação Keller-Kelliani	–	Verde	–	–

Nota: + = positivo – = negativo

Como pode ser observado na tabela 2, no extrato hidroalcoólico a 20% houve indicação positiva da presença de leucoantocianidinas, flavonóides monoméricos 3,4-dióis, nas frações acetato de etila e clorofórmio devido ao aparecimento da coloração vermelho sangue. Heterosídeos flavônicos foram confirmados nas frações acetato e clorofórmio, na fração acetato a coloração vermelha foi indicativa de flavonol e diidrofavonol, e no clorofórmio a cor amarela indicou a presença de flavona.

A pesquisa de cumarinas foi positiva para a fração clorofórmio devido à presença de fluorescência azul. Para esteróides e/ou triterpenos a reação de Libermann Bouchard indicou a presença de triterpenos nas frações hexano, acetato de etila e clorofórmio. A cor verde na fração hexano indica uma função hidroxila na posição 3 e dupla ligação em 5 e 6, e a coloração amarela do acetato de etila e clorofórmio é indicativa de presença de metila na posição C14. Na reação de Keller-Kelliani a fração hexano obteve resultado positivo com coloração verde indicando a presença de triterpenos.

A ausência de alcalóides na família foi confirmada na espécie pela análise do extrato hidroalcoólico 20%, bem como a ausência de antraquinonas.

Tabela 3 – Análise Sistemática do Extrato Aquoso

Análise	Extrato Aquoso
Heterosídeos Antocianicos	+
Heterosídeos Saponínicos	–
Heterosídeos Cianogênicos	–
Aminogrupos	+
Taninos Hidrolisáveis	–
Taninos Condensados	+
Ácidos Fixos	–
Ácidos Voláteis	–

Nota: + = positivo – = negativo

No extrato aquoso (tabela 3) foram encontrados heterosídeos antocianicos, pigmentos hidrossolúveis das plantas, com o desenvolvimento de coloração vermelha; taninos condensados devido à cor verde obtida no resíduo do papel de filtro; e aminogrupos, a coloração violácea confirmou a presença desse grupo. Saponinas, heterosídeos cianogenéticos, ácidos voláteis, ácidos fixos e taninos hidrolisáveis não foram encontrados.

Os resultados obtidos coincidem com a composição da família descrita na literatura, com a presença de protoantocianidinas, flavonóis e quercetina, sem alcalóides e saponinas.

5.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO E FRAÇÕES

Ao final do processo de extração e fracionamento obtiveram-se três frações: acetato de etila, clorofórmio e hexano. No processo de pré-purificação da fração hexano foram obtidas duas frações, a fração denominada hexano 1 foi a primeira a sair da coluna, seguida então pela fração hexano 2. Após evaporação completa dos solventes foram calculados os rendimentos de cada amostra, apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Resíduo Seco das Frações do Extrato Bruto de *Rourea induta*

Fração	Massa seca obtida (g)	Rendimento (%) em relação à massa obtida	Rendimento (%) em relação à massa inicial
Hexano 1	5,7834	5,50	0,289
Hexano 2	4,9818	4,74	0,249
Clorofórmio	39,92	38,00	1,990
Acetato de Etila	54,3579	51,75	2,717

5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

Com as frações obtidas foram isolados cinco compostos diferentes, quatro por cromatografia em coluna de sílica, um da fração hexano 1 e três da fração clorofórmio, e um por precipitação direta na fração acetato de etila.

O composto inicialmente denominado RI1 (1,5494g) foi isolado durante a concentração da fração acetato de etila, quando observou-se a formação de cristais amarelos. Esses cristais foram filtrados à vácuo em funil sinterizado G3, e após verificação de pureza por CCD foram encaminhados para identificação. Este composto foi renomeado como M5.

A fração hexano 1 foi submetida à cromatografia em coluna de sílica com eluente hexano/acetato de etila com um gradiente de 5% (cinco por cento). Foram recolhidas 34 frações de aproximadamente 10mL, e após concentração das mesmas foi observado o aparecimento de cristais brancos entre as frações 1 e 3, que após purificação com éter de petróleo e filtração em funil sinterizado G3 foram

identificados como substância M1 (1,0314g), que foi encaminhada para identificação.

Com a fração clorofórmio foi feita cromatografia em coluna de sílica com o sistema eluente hexano/acetato de etila com gradiente 5%, o qual foi até 100% de acetato de etila, seguido pelo sistema eluente de acetato de etila/metanol, também com gradiente de 5%. Foram recolhidas 52 frações de aproximadamente 15mL, e após concentração houveram algumas cristalizações entre as frações 11-16 e 28-44. Estes cristais foram purificados com uma mistura de acetato de etila e hexano de acordo com o gradiente do eluente utilizado em cada fração, e filtração à vácuo em funil sinterizado G3. Esses cristais foram reunidos de acordo com a sequência das frações obtendo-se oito amostras: fração 12 (0,0263g), fração 11 e 13 (0,0700g), fração 16 (0,0208g), fração 28-29 (0,0407g), fração 30-33 (0,0655g), fração 34-36 (0,0306), fração 37-40 (0,0253g) e fração 41-44 (0,0351g). Com essas amostras preparou-se uma CCD com fase móvel acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético, água (100:11:11:27), e revelador NEU (reativo 2-aminoetilbutirato), através da qual foi verificada a presença de quatro possíveis flavonóides, dentre os quais um estava puro, e algumas amostras apresentaram uma mistura de dois compostos. Este procedimento foi confirmado por análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) Elite Lachrom[®] em coluna RP18 5µm, através da qual também foi possível visualizar quais frações continham as mesmas substâncias. O composto puro estava presente nas frações 11-16, este foi denominado substância M2 (0,1171g) (figura 9).

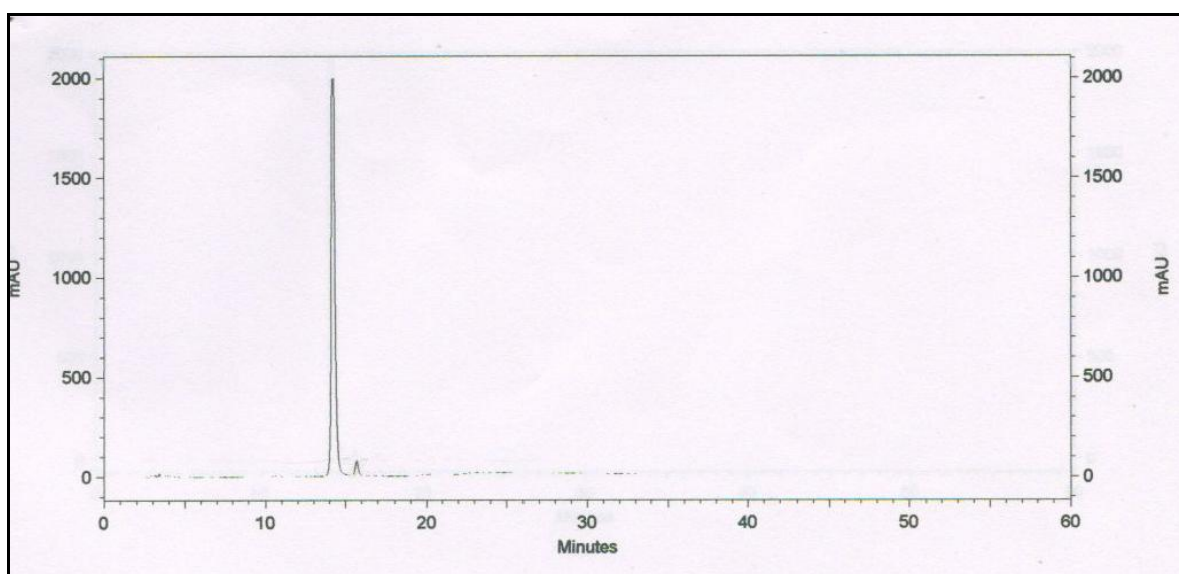


Figura 9 – Perfil Cromatográfico de Pureza do Composto M2

As amostras com as frações 30-33 e 34-36 apresentaram os mesmos compostos, essas foram reunidas e passadas em coluna de Sephadex com metanol 70% para separação dos mesmos, obtendo-se 24 frações. Da fração 5 até a 10 houve a separação do primeiro composto, o qual teve sua pureza confirmada por CLAE e foi denominado substância M3 (0,0095g). A partir da fração 19 precipitou o segundo composto, mas em quantidade muito pequena para identificação.

As frações 37-44 também foram reunidas por apresentarem uma outra mistura de substâncias. Essa amostra foi passada em coluna de Sephadex, da mesma maneira que a amostra anterior, recolhendo 23 frações. Entre as frações 4-9 houve precipitação de cristais amarelos denominados M4 (0,022g), mas após realização de CCD verificou-se que não houve separação dos dois compostos e que um deles era o composto denominado M3. Preparou-se então uma cromatografia preparativa em placa de sílica gel com fase móvel acetato de etila, acetona e água (25:8:2). Após filtração com metanol preparou-se novamente uma CCD, na qual visualmente se observou a separação dos compostos, mas após realização da técnica de RMN percebeu-se que não estava completamente puro, e que houve grande perda de massa, assim optou-se por trabalhar com a identificação da mistura.

Para a identificação desses compostos foi realizada espectroscopia de ressonância magnética nuclear ^{13}C e ^1H , ultravioleta e infravermelho.

5.3.1 Identificação da Substância M1

Este composto apresentou um ponto de fusão de 65 °C e não houve absorção no UV.

No espectro de infravermelho (figura 10) pode-se perceber que não há a presença de bandas características de hidroxila nem de carbonila, há somente duas bandas em 2918 e 2848 cm^{-1} que indicam a presença de ligação C-H de carbono sp^3 , a primeira está relacionada à deformação axial assimétrica, e a segunda à deformação axial simétrica, e em 719,45 cm^{-1} existe a banda da deformação angular assimétrica de ligação C-H. Aproximadamente em 2960 cm^{-1} há uma banda indicativa da presença de CH_3 (SILVERSTEIN; BASSLER e MORRIL 1994).

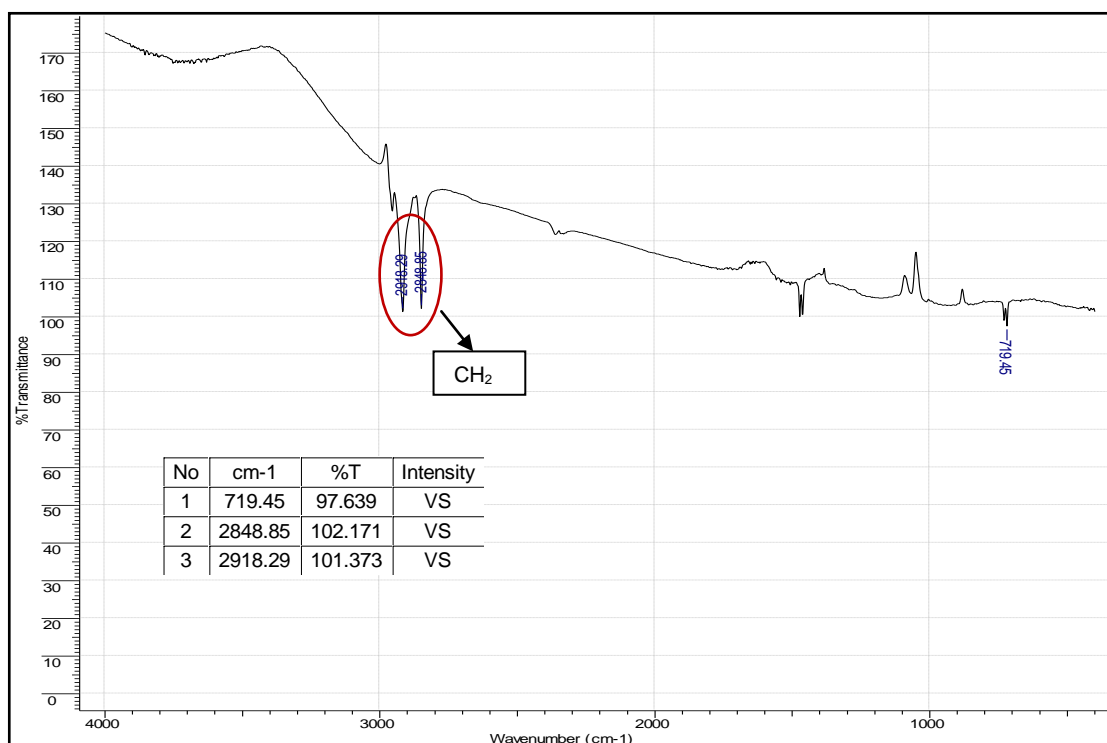


Figura 10 – Espectro de Absorção no Infravermelho da Substância M1

O espectro de RMN- ^{13}C para M1, usando como solvente CDCl_3 à 75 MHz, apresentou sinais na região de 14 a 32ppm. Através da análise de espectro DEPT 135° foi possível constatar que o sinal em $\delta 14,3$ é de um CH_3 , e os sinais entre $\delta 22$ - $\delta 32$ são todos referentes a CH_2 (figura 11). Os resultados podem ser observados na tabela 5, comparados com os dados da literatura de Siddiqui *et al.* (2004).

Tabela 5 – Deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C da Substância M1

Experimental	SIDDIQUI <i>et al.</i> (2004)
32,1	32,1
29,9	29,8
29,6	29,5
22,9	22,8
14,3	14,1

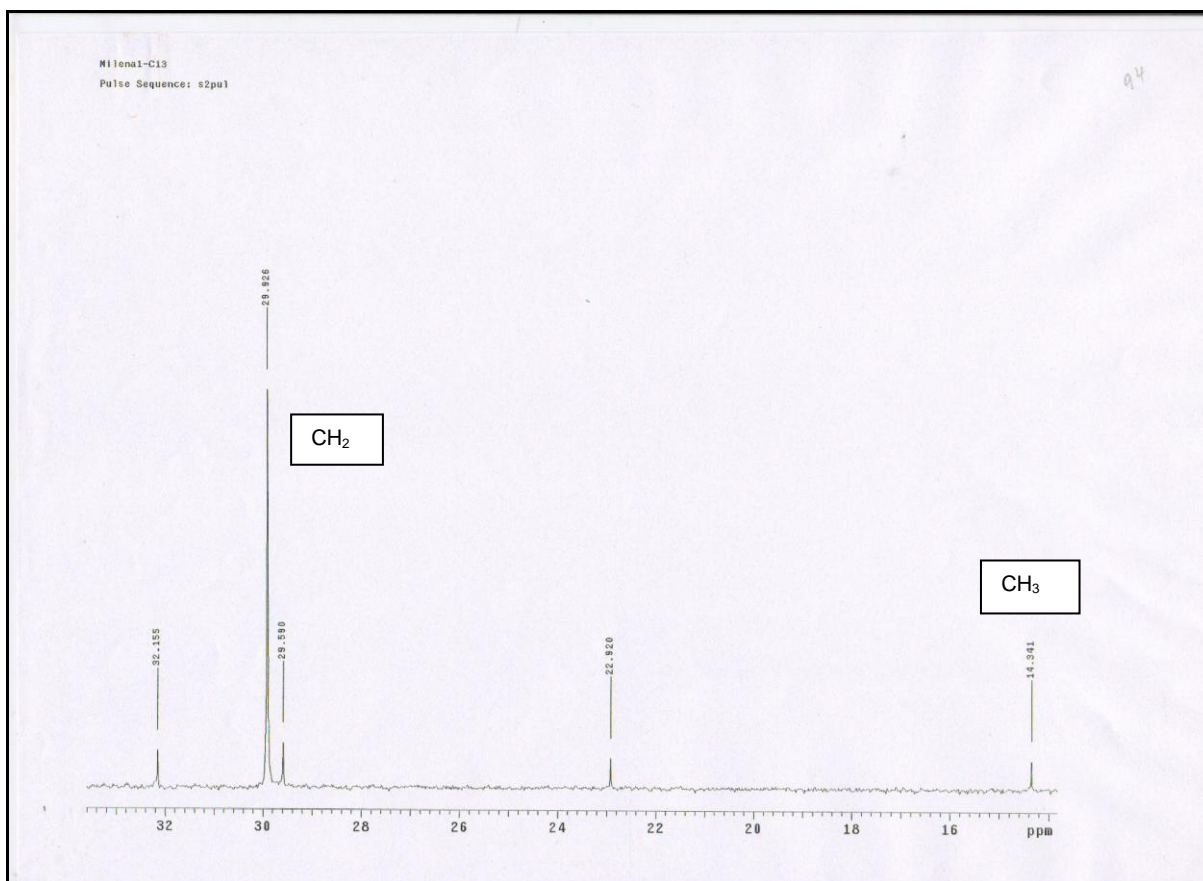


Figura 11 - Espectro de RMN- ^{13}C da Substância M1

No espectro de RMN- ^1H (figura 12) observou-se todos os deslocamentos na região de 0,8 a 1,7ppm, região característica de compostos alifáticos alicíclicos. Em $\delta 0,8$ tem-se o deslocamento dos três hidrogênios do CH_3 , o deslocamento em $\delta 1,26$ indica, devido a sua integração, a presença de aproximadamente 32 hidrogênios correspondentes a CH_2 , o que indica tratar-se de um hidrocarboneto de cadeia longa. A determinação do tamanho da cadeia carbônica foi dada pelo espectro de massa (figura 13), o qual apresentou uma fragmentação característica de hidrocarboneto alifático com o íon molecular m/z (rel. int.) igual a 338, correspondendo ao hidrocarboneto n-tetracosano, cuja fórmula molecular é $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CH}_3$ (SIDDIQUI *et al.*, 2004).

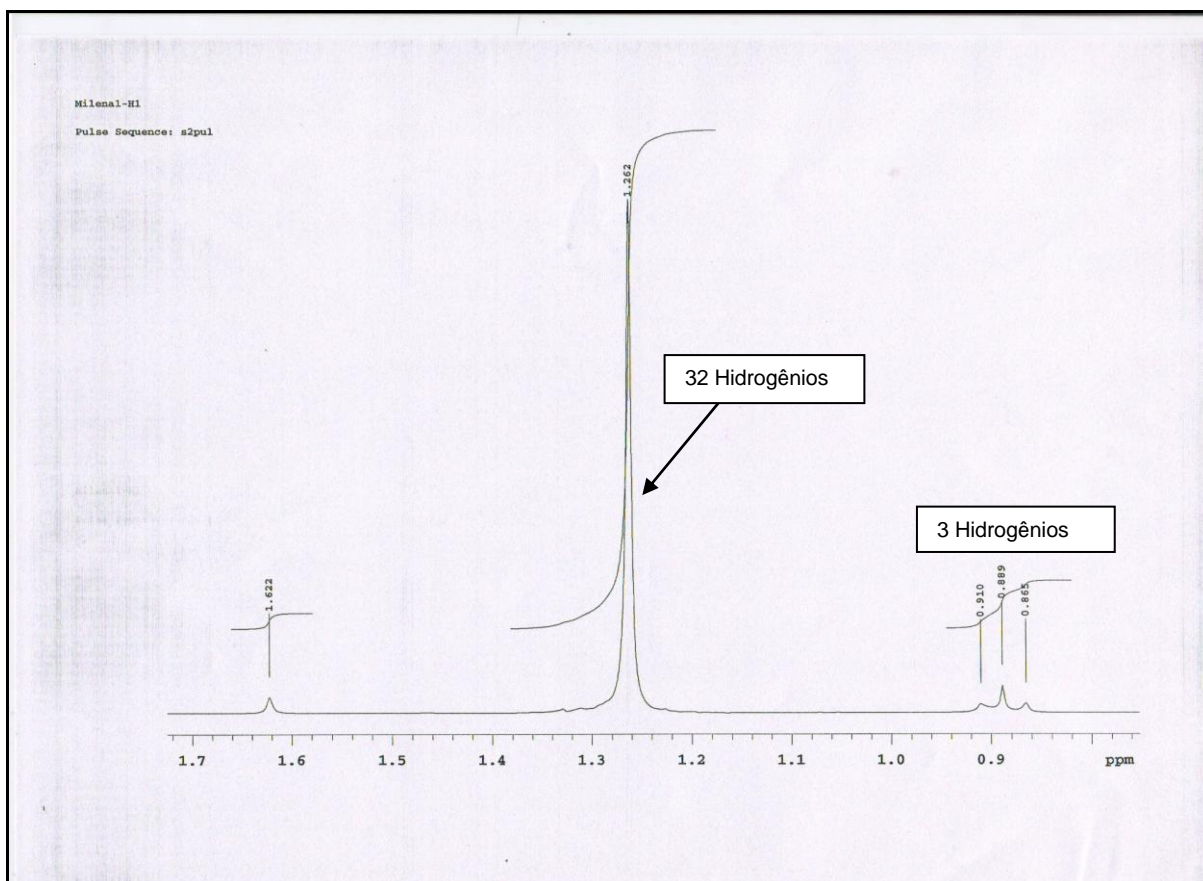


Figura 12 – Espectro de RMN- ^1H da Substância M1

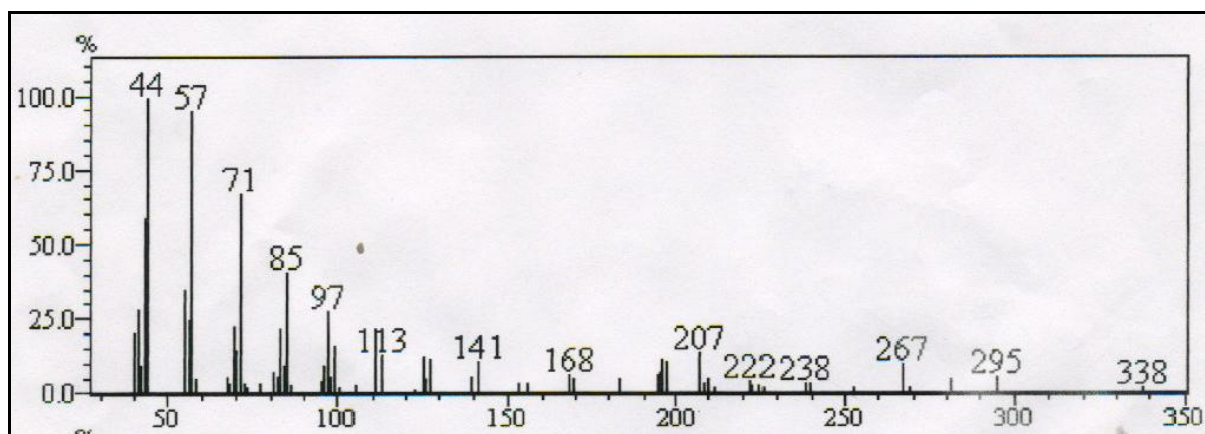


Figura 13 – Espectro de Massa da Substância M1

5.3.2 Identificação Substância M2

No aspecto físico este composto apresentou-se como cristais amarelos amorfos com ponto de fusão de 250°C. No espectro de absorção no infravermelho (figura 14) apresentou uma banda larga de absorção em 3406 cm^{-1} e 3294 cm^{-1} característica da presença do OH (deformação axial), uma banda em 1664 cm^{-1} relativa à presença de carbonila conjugada, e um conjunto de bandas entre 1610 e 1400 cm^{-1} características de insaturação (C=C) do anel aromático. As bandas entre 1000 e 675 cm^{-1} representam as deformações angulares de C-H do anel (SILVERSTEIN; BASSLER e MORRIL 1994).

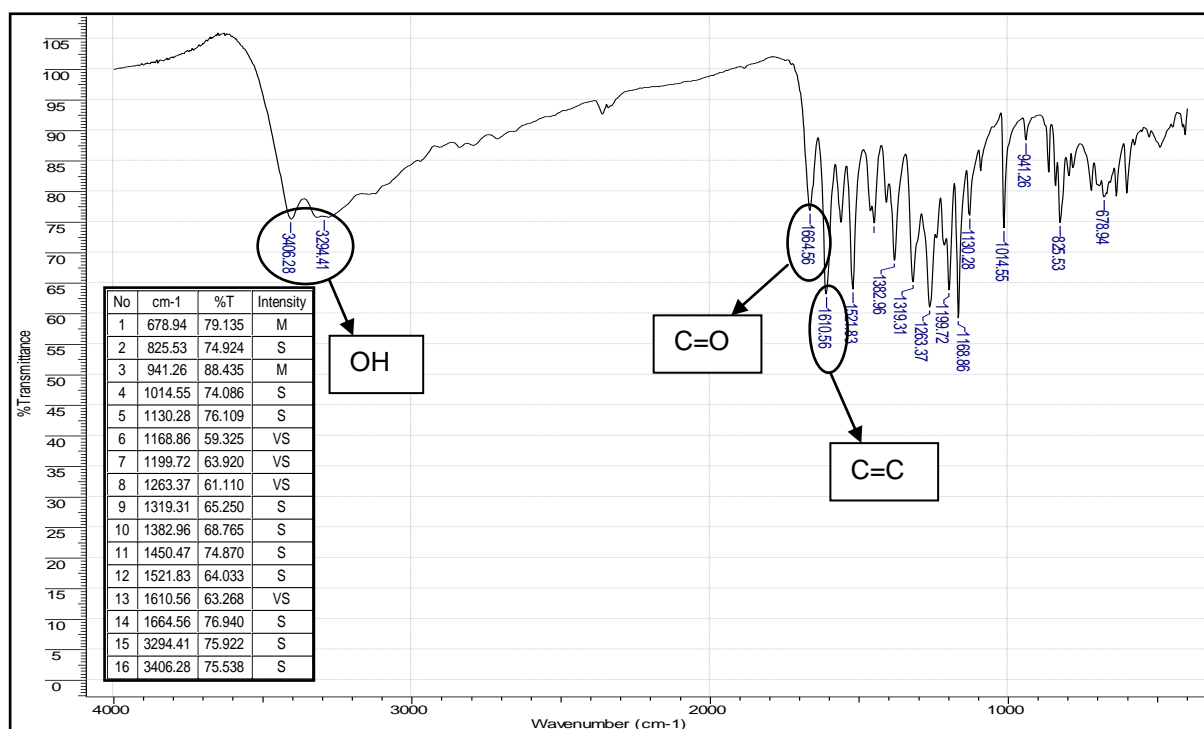


Figura 14 – Espectro de Absorção no Infravermelho da Substância M2

Os espectros de UV obtidos de acordo com Mabry, Markham e Thomas (1970), são apresentados nas figuras 15 e 16.

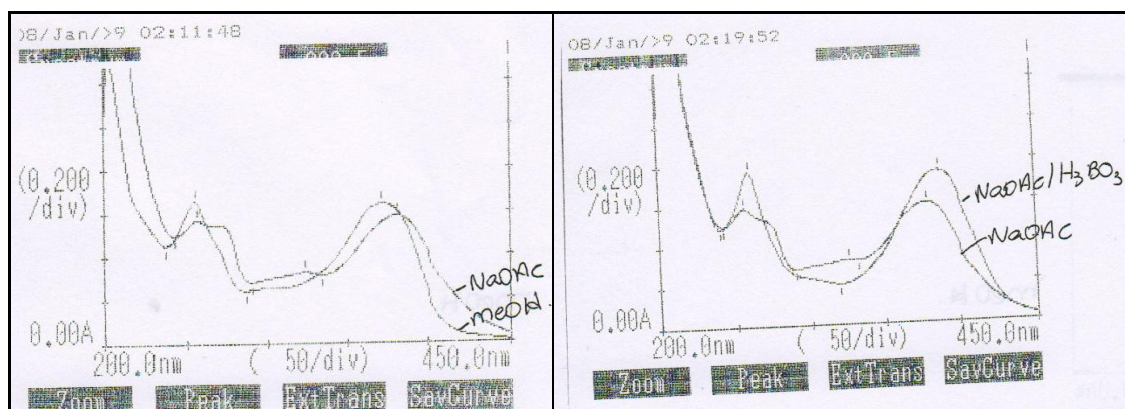


Figura 15 - Espectro de Absorção no UV da Substância M2 com NaOAc e H_3BO_3 .

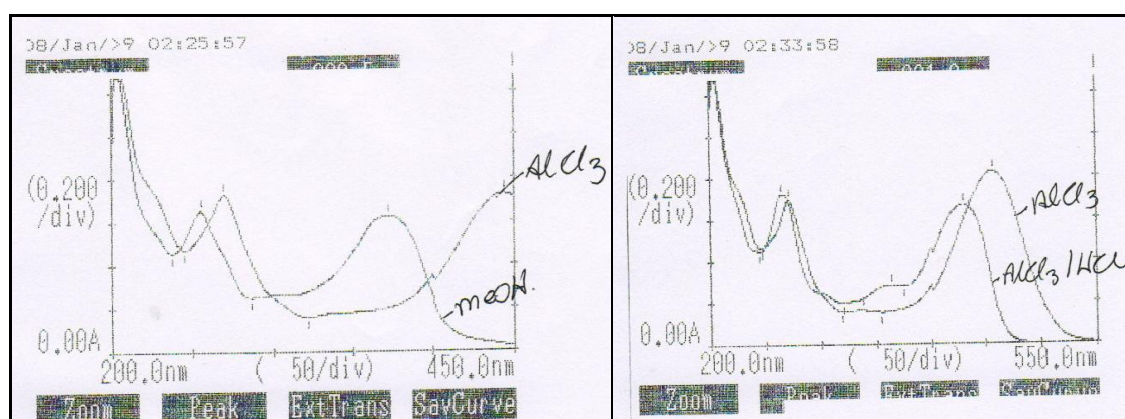


Figura 16 – Espectro de Absorção no UV da Substância M2 com AlCl_3 e HCl .

Os espectros de ultravioleta para flavonóides, em MeOH, exibem duas bandas de maior absorção na região de 240-400 nm. A banda I absorve entre 300-380 nm e a banda II entre 240-280 nm. A banda I se refere ao anel B (cinamoil) e a banda II representa o anel A (benzoil).

A substância M2, em metanol, apresentou bandas (λ_{max}) em 373 nm, referentes ao anel B, e em 256, 266(ombro) nm, referentes ao anel A. Na presença de NaOAc houve deslocamento das bandas para (λ_{max}) 381; 325,5; 272, 256,5(ombro) nm. O NaOAc ioniza as hidroxilas fenólicas de flavonas e flavonols (hidroxilas 3,7 e 4'), mas é particularmente usado para identificar a hidroxila 7 livre, quando ocorre um deslocamento batocrômico de 5-20nm da banda II, se houver hidroxilas em C-6 e C-8 este deslocamento não é perceptível. No espectro de M2 ocorreu um deslocamento de 16nm, confirmando a hidroxila livre em C-7. A adição

de H_3BO_3 à solução quebra os grupos ortodihidroxila em todas as posições no flavonóide, exceto em C-5 e C-6, ocorrendo um deslocamento batocrômico da banda I de 12-30nm em compostos com anel B contendo grupos ortodihidroxila em C-3' e C-4'. Para M2 com H_3BO_3 obteve-se bandas em (λ_{max}) 387,5 e 260 nm, podendo-se observar o deslocamento de aproximadamente 15nm da banda I, confirmando a presença do grupamento ortodihidroxila no anel B.

A presença de AlCl_3 forma complexos estáveis com compostos que tem grupos hidroxila em C-3 ou C-5, e complexos menos estáveis (lábeis) com grupos ortodihidroxila. O complexo formado com os grupos ortodihidroxila decompõe rapidamente, mas a complexação com o grupamento cetona na posição 4 e o grupo 5-hidroxila formam um complexo estável na presença do ácido HCl. Com adição de HCl ocorre um deslocamento hipsocrômico da banda I (30-40nm) devido a decomposição do complexo com o grupo ortodihidroxila, verificando assim a presença deste grupo no anel B. Ainda com HCl na presença de AlCl_3 é possível verificar a presença dos grupos 3 e/ou 5-hidroxila, espectros de substâncias com esses grupamentos apresentam a banda I com deslocamento batocrômico em relação ao espectro com MeOH, para 3,5-hidroxiflavonas esse deslocamento é em torno de 50-60nm, para 5-hidroxiflavonas com a posição 3 substituída é de 35-55nm, e já para 3-hidroxiflavonas em torno de 60nm.

Para o composto M2 em AlCl_3 houve deslocamento batocrômico das duas bandas (λ_{max}) 458, 337, e 271,4 nm. A adição de HCl levou as bandas para (λ_{max}) 430, 363, e 265,5 nm. Estes resultados demonstram o efeito hipsocrômico de 28nm da banda I entre os dois espectros, devido à decomposição do complexo com o grupo ortodihidroxil do anel em C-3' e C-4'. Com relação ao espectro em MeOH, ocorreu um efeito batocrômico da banda I de 57nm, confirmando a presença dos grupos hidroxilas livres em C-3 e C-5, como descrito acima.

Os deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C (figura 17 e 18) e RMN- ^1H (figura 19 e 20) foram obtidos à 300 MHz utilizando CD_3OD como solvente, e sua análise revelou a presença de 15 carbonos, confirmando o esqueleto carbônico de flavonóides. A absorção de ^1H na região de 6-8ppm caracteriza a presença de compostos aromáticos. Os resultados podem ser observados na tabela 6, comparados com a literatura de Andersen e Markham (2006).

Tabela 6 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN ^{13}C e RMN- ^1H da Substância M2

Posição	Experimental		ANDERSEN E MARKHAM (2006)
	^{13}C	^1H	^{13}C
2	147,8	-	148,00
3	137,1	-	137,21
4	177,2	-	177,33
5	162,3	-	162,50
6	99,1	6,17 <i>d</i> ($J=2,1\text{Hz}$)	99,25
7	165,3		165,34
8	94,4	6,36 <i>d</i> ($J=2,1\text{ Hz}$)	94,40
9	158,1	-	158,22
10	104,1	-	104,52
1'	124,0	-	124,15
2'	115,9	7,72 <i>d</i> ($J=2,1\text{ Hz}$)	115,99
3'	148,5	-	148,75
4'	146,0	-	146,21
5'	116,1	6,8 <i>d</i> ($J=8,4\text{ Hz}$)	116,22
6'	121,6	7,6 <i>dd</i> ($J=8,7; 2,1\text{Hz}$)	121,67

Nota: *d*= dubleto, *dd*= duplo dubleto, *J*= constante de acoplamento

Os sinais dos hidrogênios aromáticos em $\delta 7,72$ ($\text{H}2'$) com $J=2,1\text{Hz}$, $\delta 6,8$ ($\text{H}5'$) com $J=8,4\text{Hz}$, e $\delta 7,6$ com $J=8,7; 2,1\text{Hz}$ ($\text{H}6'$) indicam acoplamento meta entre $\text{H}2'$ e $\text{H}6'$, e acoplamento orto entre $\text{H}5'$ e $\text{H}6'$, caracterizando uma dioxigenação do anel B em $\text{C}3'$ e $\text{C}4'$. Nesta região também se observou os dubletos referentes aos hidrogênios $\text{H}6$ ($\delta 6,17$) e $\text{H}8$ ($\delta 6,36$), ambos com $J=2,1\text{Hz}$, característico de um acoplamento meta de um anel aromático, os quais correspondem ao anel A do flavonóide substituído em C-5 e C-7 (LHUILLIER, 2007).

O experimento DEPT (figura 21) revelou a presença de cinco grupamentos CH, sem indicação de grupos CH_3 , e as correlações entre carbono e hidrogênio foram observadas pelo experimento gHSQC (figura 22).

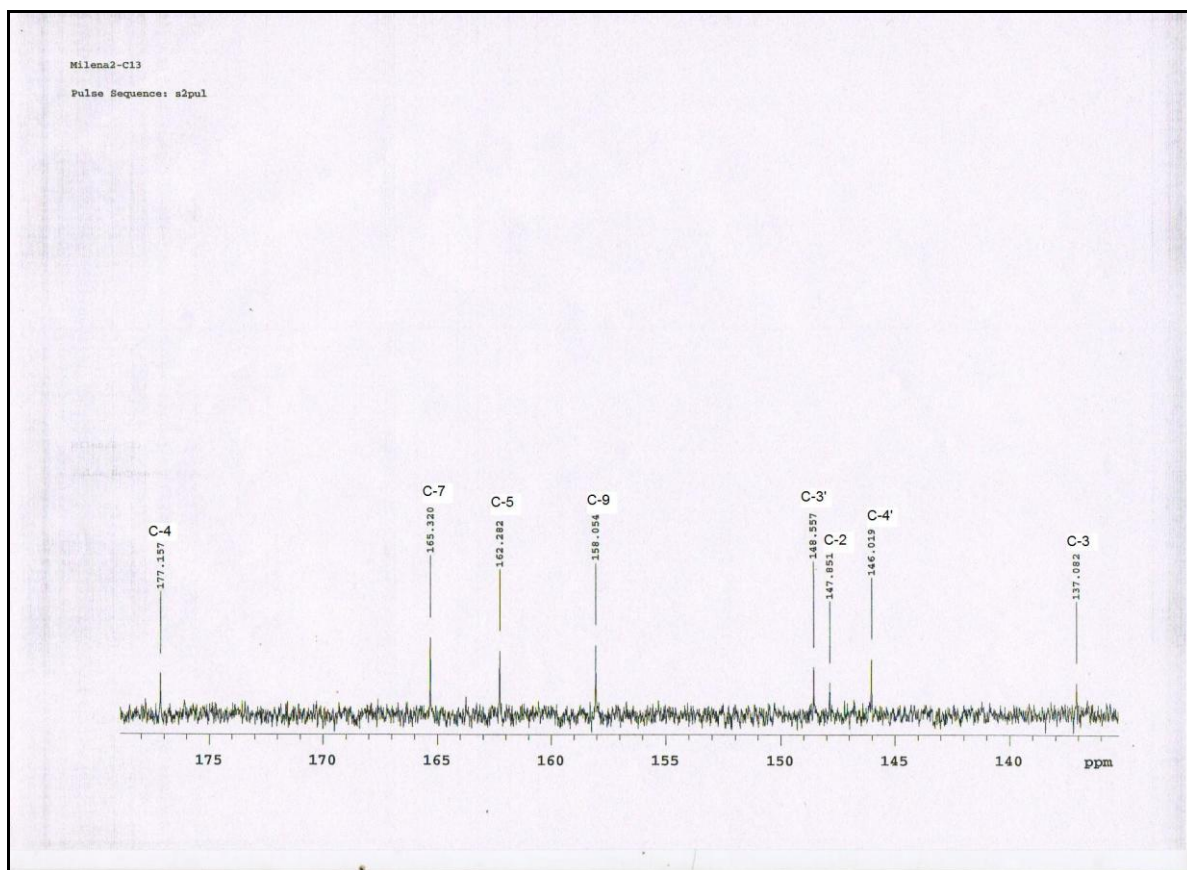


Figura 17 - Expansão do Espectro de RMN- ^{13}C (137-177ppm) da Substância M2

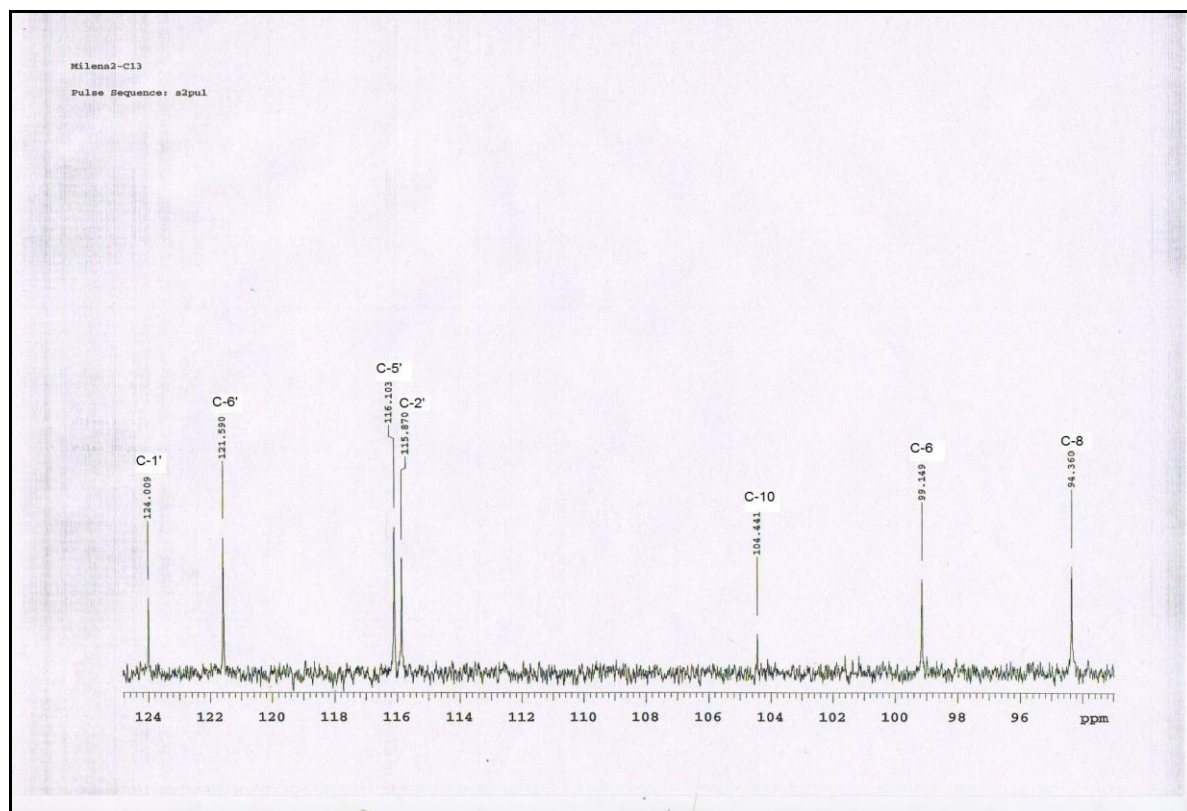


Figura 18 - Expansão do Espectro de RMN- ^{13}C (94-124ppm) da Substância M2

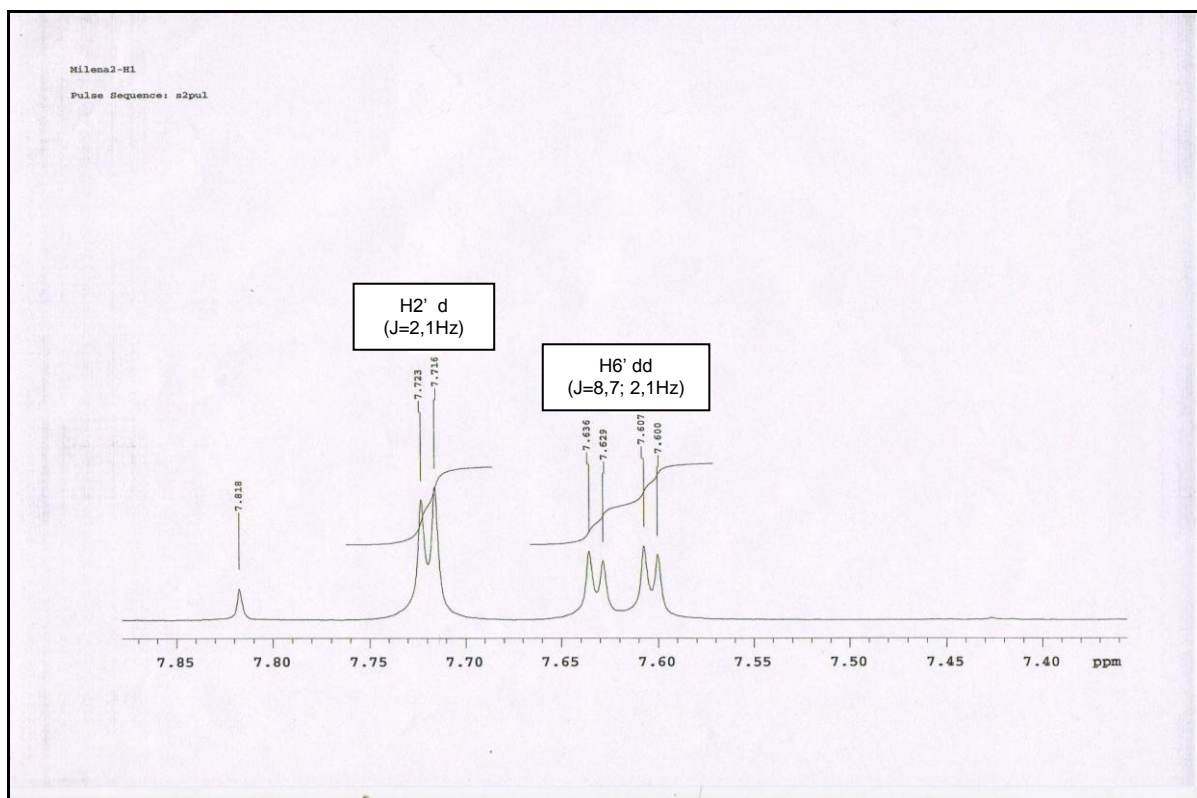


Figura 19 - Expansão do Espectro de RMN- ^1H (7,4-7,8ppm) da Substância M2

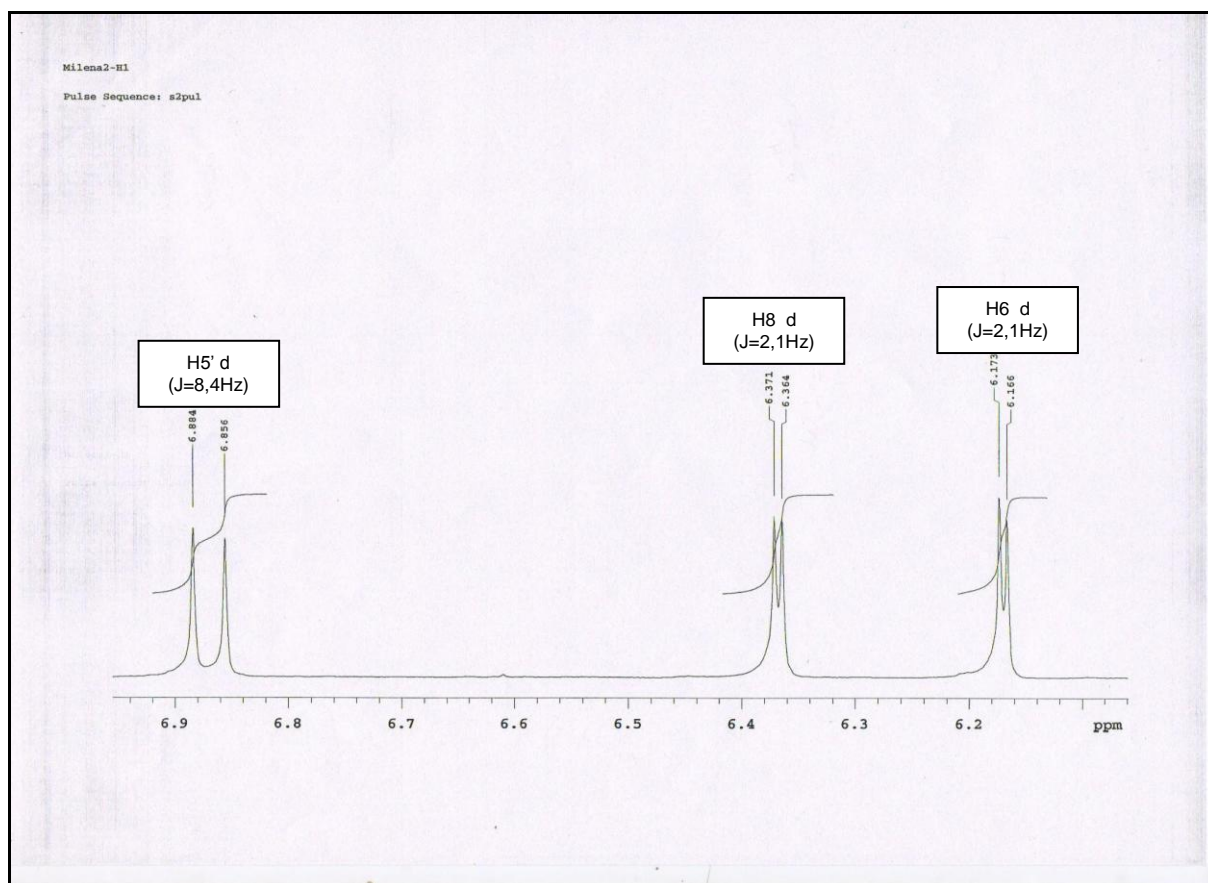


Figura 20 - Expansão do Espectro de RMN- ^1H (6,2-6,9ppm) da Substância M2

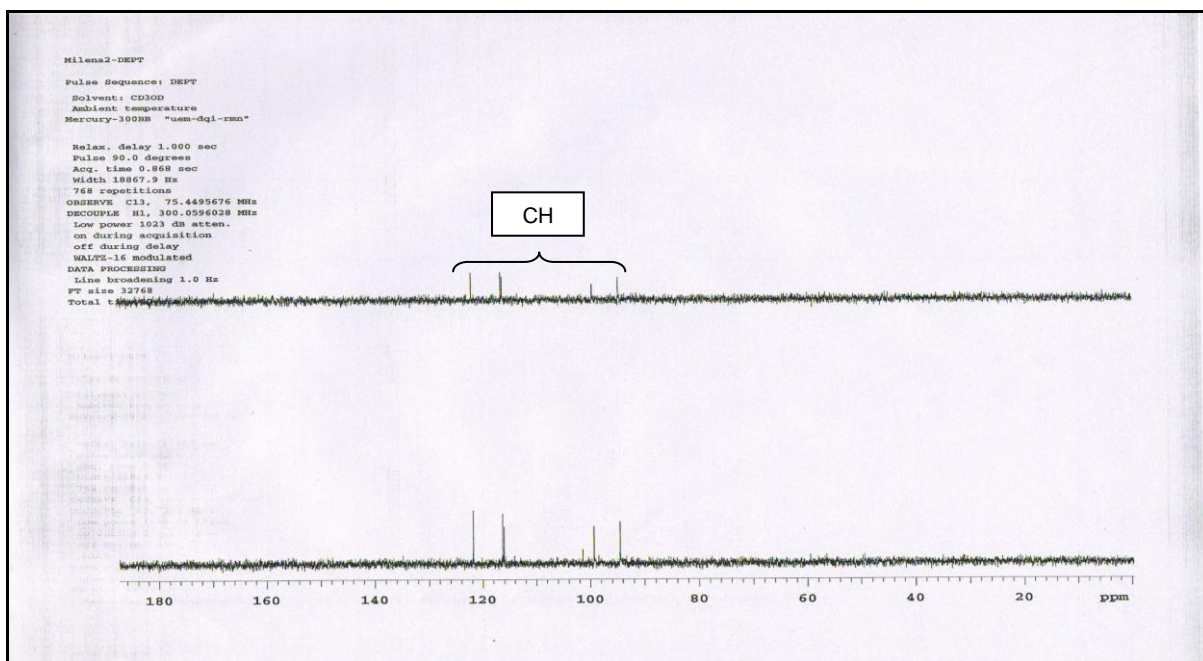


Figura 21 - Espectro DEPT da Substância M2

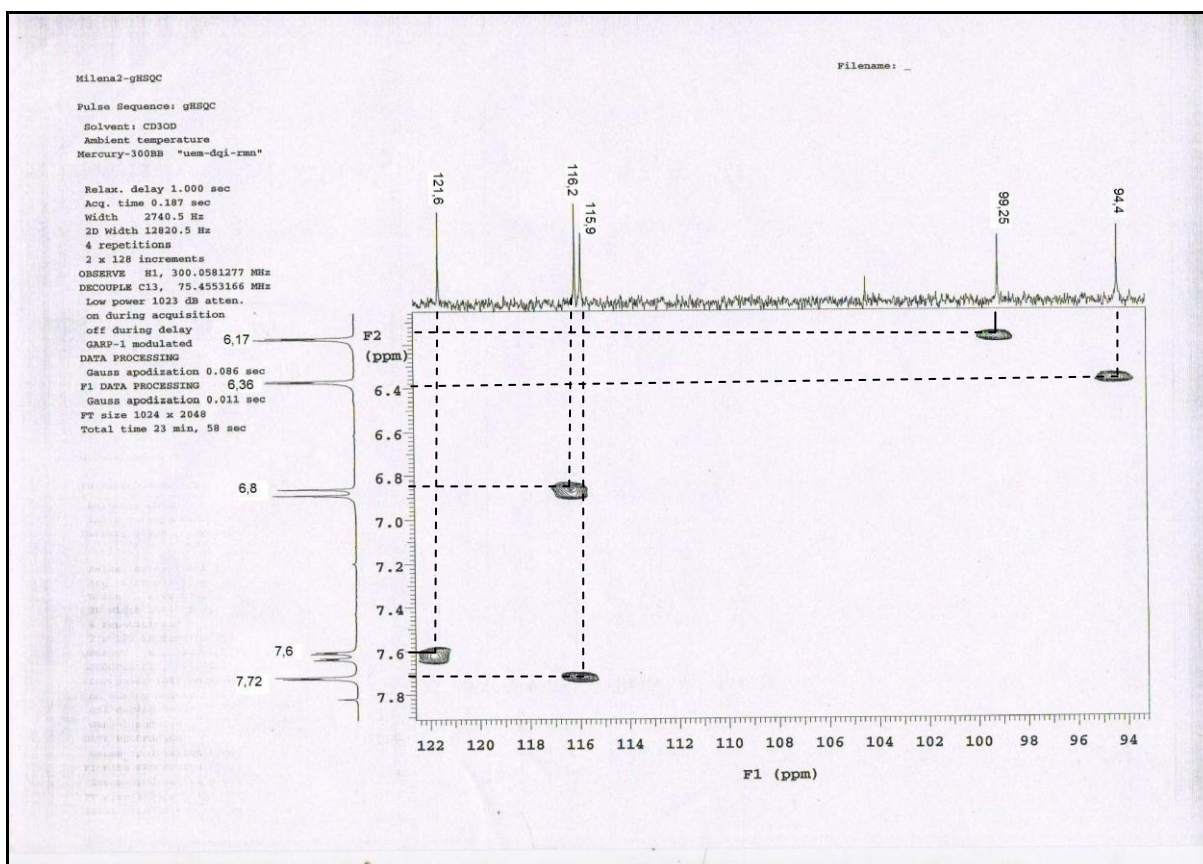


Figura 22 - Espectro gHSQC da Substância M2

Através dos resultados obtidos e pela comparação com dados da literatura pode-se concluir que o composto M2 é o flavonóide quercetina, o qual tem sua estrutura química ilustrada na figura 23.

A quercetina é um flavonóide amplamente distribuído no reino vegetal, o qual possui uma elevada capacidade antioxidante na remoção de radicais livres, exercendo assim um papel citoprotetor, além dessa atividade este flavonóide apresenta atividade antiinflamatória, imunomoduladora e antitumoral (BÜRGER, 2008). Este flavonóide também foi identificado na fração butanol do extrato etanólico das folhas da espécie *Byrsocarpus coccineus* pertencente à família Connaraceae (AHMADU et al., 2007).

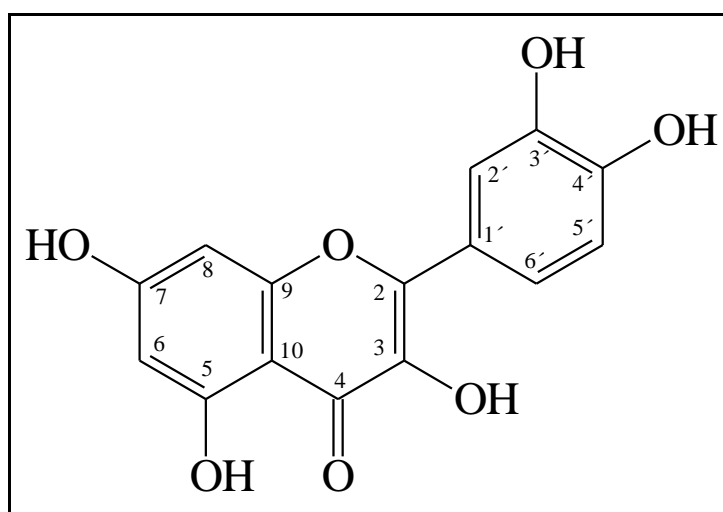


Figura 23 - Estrutura Química da Quercetina

5.3.3 Identificação Substância M3

Este composto se apresentou como um pó amarelo amorfo, com ponto de fusão de 205°C. O espectro de infravermelho (figura 24) apresentou uma banda larga em 3427 e 3311 cm^{-1} característica da deformação axial do grupamento OH. A banda em 1652 cm^{-1} é relativa à presença de carbonila conjugada. Bandas entre

1606 e 1360 cm^{-1} são relativas à insaturação C=C, e entre 1000 e 800 cm^{-1} representam as deformações angulares de C-H do anel aromático. Em aproximadamente 2900 cm^{-1} há dois picos menos intensos, esses são indicativos da presença de CH_2 (SILVERSTEIN; BASSLER; e MORRIL 1994).

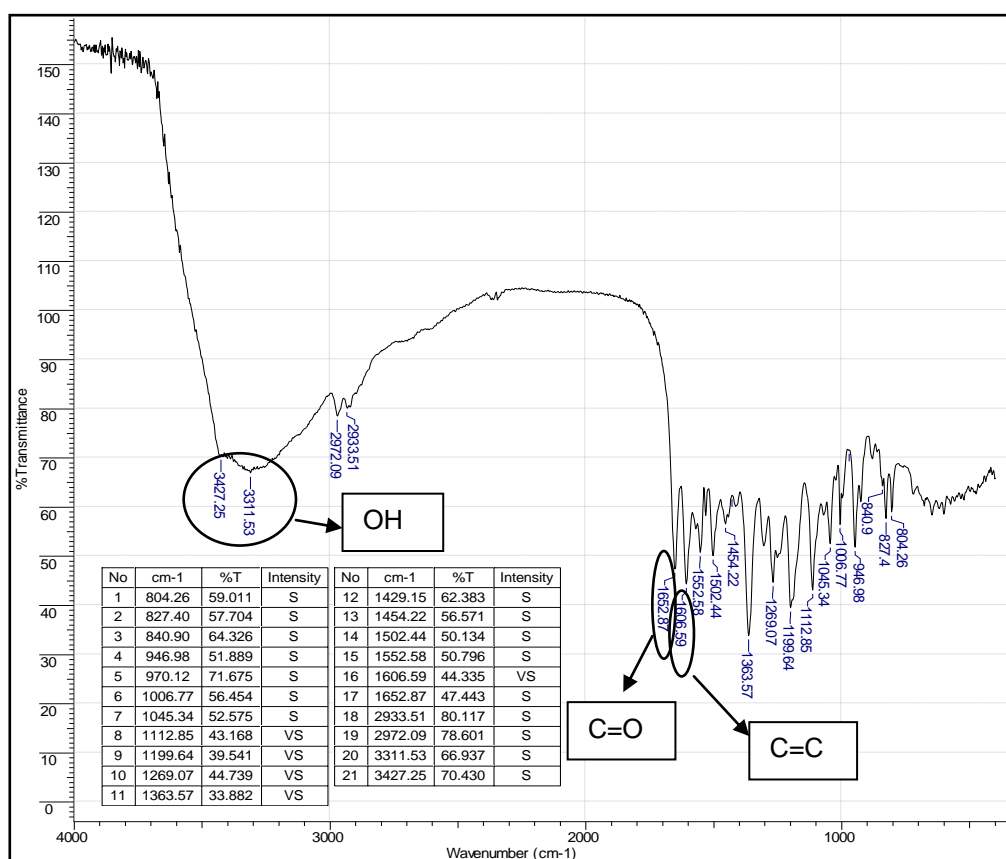


Figura 24 – Espectro de Absorção no Infravermelho da Substância M3

A espectrometria de UV revelou um comportamento típico de flavonóide. Os espectros podem ser observados nas figuras 25 e 26.

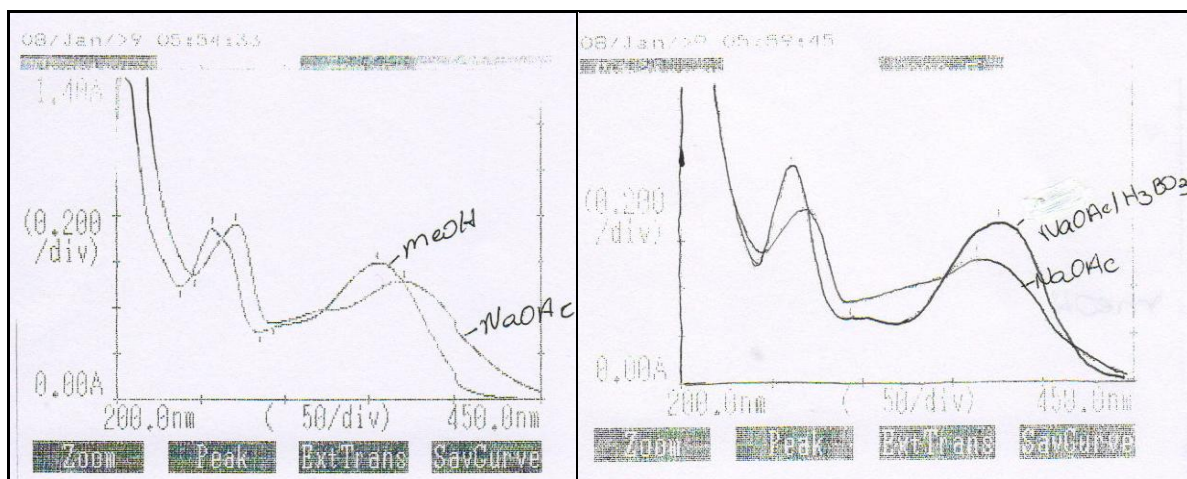


Figura 25 - Espectros de Absorção no UV da Substância M3 com NaOAc e H_3BO_3 .

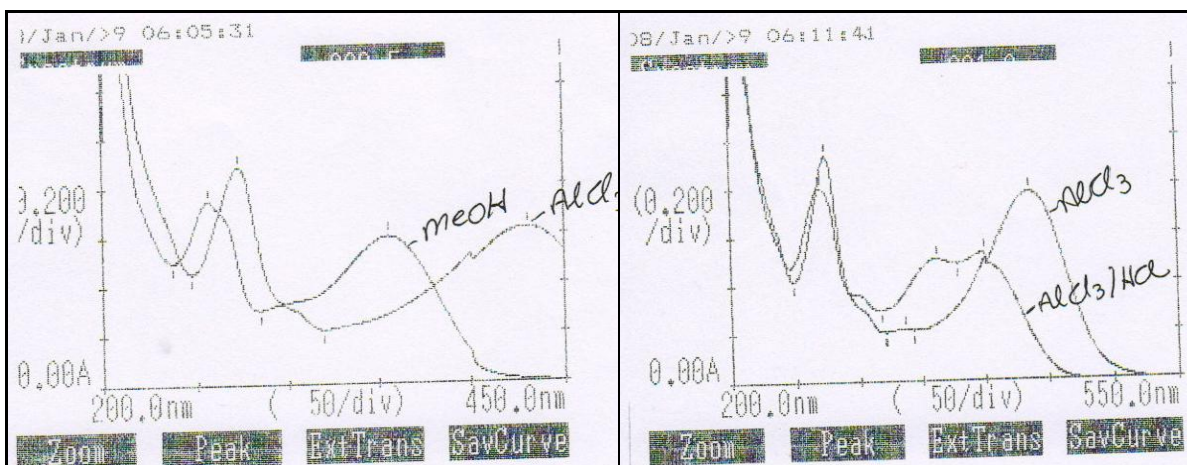


Figura 26 - Espectro de Absorção no UV da Substância M3 com $AlCl_3$ e HCl.

O espectro original em metanol apresentou bandas em (λ_{max}) 355, 257 e 267(ombro), características as bandas I e II de flavonóides. A banda I relativa ao anel B sofreu um deslocamento hipsocrômico de 18 nm em relação à quercetina (substância M2), este efeito é devido à substituição em C-3 (SANTOS, SCHRIPEMA e KUSTER, 2005). A adição de NaOAc levou a um efeito batocrômico da banda II de 14nm (λ_{max} : 370 e 271nm) característico ao deslocamento referente à hidroxila livre em C-7 e ausência de hidroxila em C-6 e C-8. Em presença de H_3BO_3 as bandas foram obtidas em (λ_{max}) 375, 310 e 261nm, apresentando um deslocamento batocrômico de 20nm da banda I, referente à presença do grupamento ortodihidroxila em C-3' e C4'.

O espectro com AlCl_3 revelou bandas em (λ_{max}) 436, 303(ombro) e 275nm, deslocamento batocrômico das duas bandas, sugerindo a presença de sistema ortodihidroxi e hidroxi em C-5. A adição de HCl deslocou estas bandas para (λ_{max}) 400, e 270nm. Esse deslocamento hipsocrômico, na presença de HCl em relação ao espectro com AlCl_3 , da banda I confirma a presença ortodihidroxi no anel B. Em relação ao espectro original em metanol o deslocamento batocrômico da banda I foi de 45nm, referente a presença do grupamento 5-hidroxi com a posição 3 substituída.

Os deslocamentos químicos de RMN ^{13}C e ^1H foram obtidos com solvente CD_3OD à 300 MHz. Os espectros de RMN- ^{13}C revelaram a presença dos 15 carbonos características da estrutura básica dos flavonóides e mais cinco carbonos entre 60 e 80ppm, região característica de açúcar, referentes a uma pentose (figura 27). No espectro de RMN- ^1H foram observados os deslocamentos na região de 6-8ppm referentes aos anéis aromáticos de flavonóides, além de deslocamentos na região de 3-4,2ppm, característicos de açúcares, confirmando assim a presença de uma unidade de açúcar (figuras 28, 29 e 30).

Os deslocamentos de RMN- ^{13}C e os hidrogênios em δ 6,9 ($\text{H5}'$), δ 7,5 ($\text{H2}'$), δ 7,4 ($\text{H6}'$), correspondentes ao anel B, e os hidrogênios em δ 6,2 (H6) e δ 6,38 (H8) correspondentes ao anel A, evidenciam que o composto é um derivado da quercetina. A localização do glicosídeo é dada pelo deslocamento, em relação ao espectro da quercetina, observado em C-3 e C-2. Neste composto C-3 está protegido em torno de 3ppm e C-2 foi desprotegido em torno de 10ppm, deslocamento que só pode ocorrer com a presença de uma substituição em C-3, comprovando assim a presença da unidade de açúcar nesta posição.

Os dados de RMN- ^{13}C são de grande valia na determinação da estrutura de um flavonóide glicosilado, pois a partir destes dados é possível estabelecer o número de açúcares ligados, a natureza dos mesmos, bem como a posição, configuração e conformação (AGRAWAL 1989). A identificação do açúcar de M3 foi baseada por comparação com espectros da literatura e foi definido como arabinose na forma de furanosídeo (VVDENSKAYA *et al*, 2004; RODRIGUES, 2007). A diferença entre α -furanose e α -piranose pode ser observada pelos deslocamentos químicos dos carbonos 1'', 2'' e 4''. Segundo Agrawal (1989) a furanose apresenta estes valores em campo mais baixo, de 4-14ppm, tendo-se para piranose C-1'' δ 104,7; C-2'' δ 71,6 e C-4'' δ 69,1, e para furanose C-1'' δ 109,1; C-2'' δ 81,5 e C-4''

δ 84,7. Observando os sinais obtidos em δ 109,5; 83,3 e 87,9 pode-se confirmar que o açúcar é a arabinofuranose. A configuração em α ou β pode ser obtida pela constante de acoplamento do hidrogênio anomérico (H1''), como este hidrogênio se apresentou como um singlete largo em metanol, foi realizado outro experimento de RMN- ^1H em DMSO- d_6 , com equipamento de 400MHz. Com este solvente houve desdobramento do sinal como um dubleto em δ 5,58 (figura 31), cuja constante de acoplamento foi medida em $J=1,00\text{Hz}$, indicando assim uma configuração α para este açúcar (LHUILIER, 2007 e ZHANG *et al*, 2005).

As correlações entre carbono e hidrogênio foram obtidas pelo experimento gHSQC (figura 32 e 33), através do qual definiu-se qual carbono está relacionado a qual hidrogênio. O experimento DEPT revelou a presença de apenas um CH_2 e nove grupos CH (figura 34).

A tabela 7 mostra os dados experimentais obtidos comparados com a literatura de Vvdenskaya *et al*. (2004) e Lhuillier (2007).

Tabela 7 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN- ^{13}C e RMN- ^1H da Substância M3

Posição	Experimental		VVDENSKAYA <i>et al</i> (2004)		LHUILIER (2007)	
	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H
2	158,5	-	-	-	158,2	-
3	134,9	-	-	-	133,7	-
4	179,9	-	-	-	178,8	-
5	163,1	-	-	-	161,8	-
6	99,9	6,2 <i>sl</i>	99,5	6,14	98,9	6,21 <i>d</i> ($J=2,0\text{Hz}$)
7	166,0	-	-	-	164,8	-
8	94,7	6,38 <i>sl</i>	94,3	6,35	93,5	6,4 <i>d</i> ($J=2,0\text{Hz}$)
9	159,4	-	-	-	157,4	-
10	105,6	-	-	-	104,4	-
1'	123,1	-	-	-	121,9	-
2'	116,8	7,5 <i>d</i> ($J=3,3\text{Hz}$)	116,1	7,43	115,7	7,54 <i>d</i> ($J=2,1\text{Hz}$)
3'	149,9	-	-	-	145,1	-
4'	146,4	-	-	-	148,7	-
5'	116,4	6,9 <i>d</i> ($J=8,4\text{Hz}$)	116,2	6,79	115,3	6,92 <i>d</i> ($J=8,3\text{Hz}$)
6'	122,9	7,4 <i>sl</i>	122,4	7,5	121,8	7,5 <i>dd</i> ($J=8,3$ e $2,1\text{Hz}$)
Arabinofuranose						
1''	109,5	5,5 <i>s</i>	108,6	5,53	108,5	5,48 <i>d</i> ($J=1,0\text{Hz}$)
2''	83,3	4,3 <i>d</i> ($J=2,4\text{Hz}$)	83,0	4,11	82,1	4,35 <i>dd</i> ($J=3,0$; $1,0\text{Hz}$)
3''	78,6	3,9 <i>dd</i> ($J=4,2$; $2,4\text{Hz}$)	77,6	3,67	77,5	3,93 <i>dd</i> ($J=5,0$; $3,0\text{Hz}$)
4''	87,9	3,8 <i>dd</i> ($J=4,2$; $8,5\text{Hz}$)	86,8	3,51	86,8	3,89 <i>m</i>
5''	62,5	3,5 <i>m</i> (2H)	61,6	3,25	61,4	3,52 <i>dd</i> ($J=11,5$; $4,0\text{Hz}$) 3,48 <i>dd</i> ($J=11,5$; $3,6\text{Hz}$)

Nota: d= dubleto, dd= duplo dubleto, s= singlete, sl= singlete largo, m= multiplete, J = constante de acoplamento

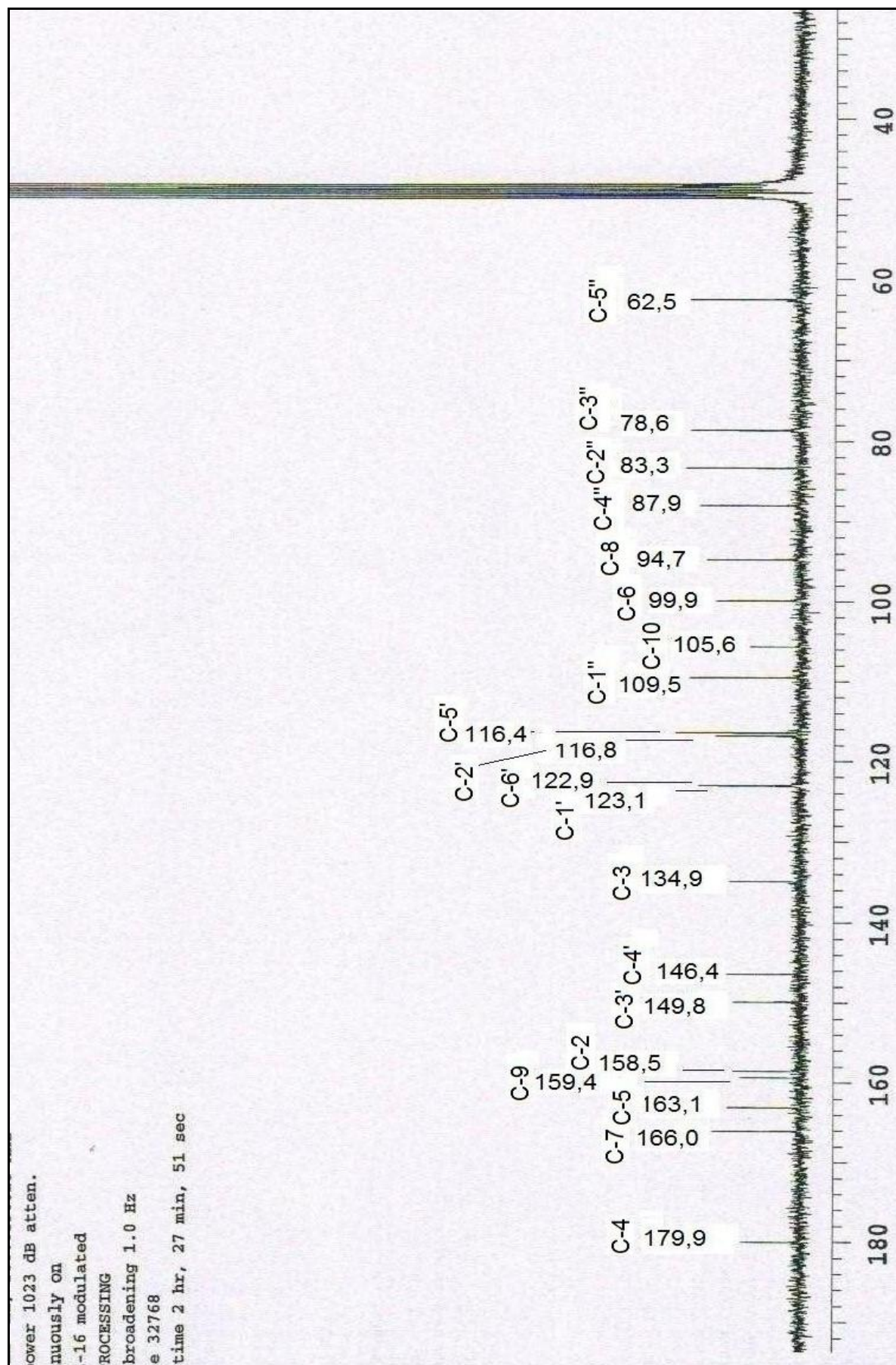
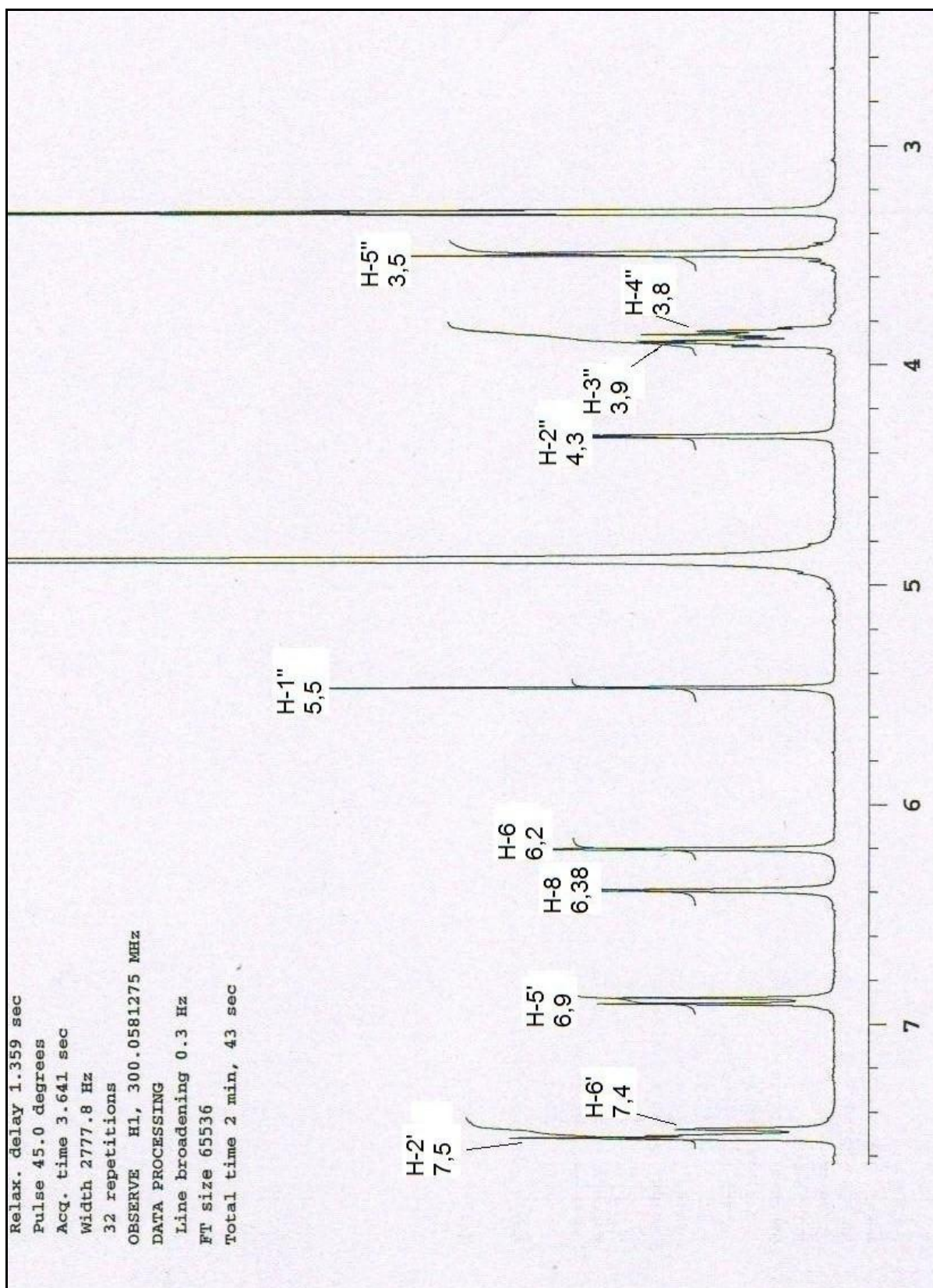


Figura 27 - Espectro de RMN- ^{13}C da Substância M3

Figura 28 - Espectro de RMN- ^1H da Substância M3

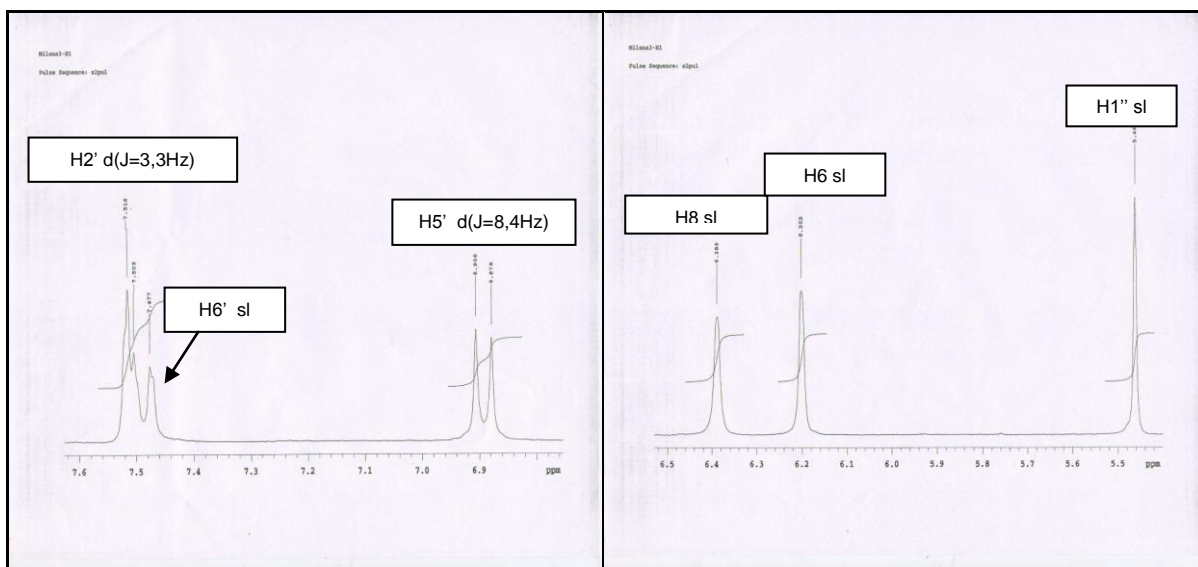


Figura 29 – Expansão do Espectro de RMN-¹H (5,5 – 7,5ppm) da Substância M3

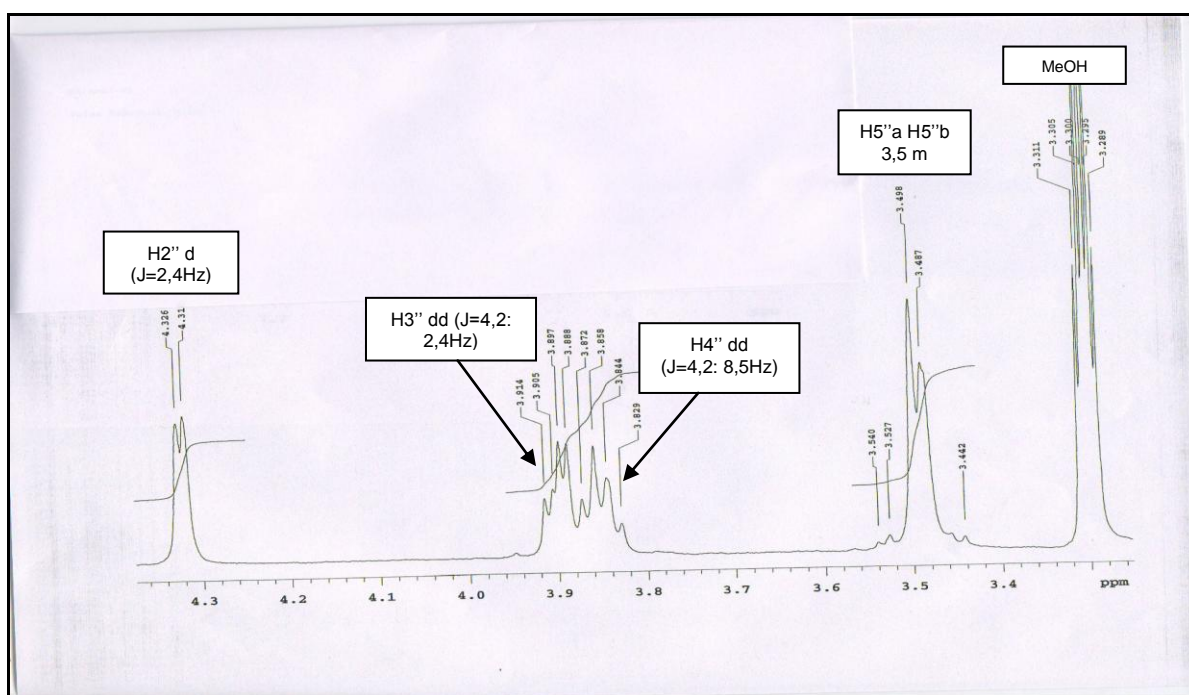


Figura 30 – Expansão do Espectro de RMN-¹H (3,3 – 4,3ppm) da Substância M3

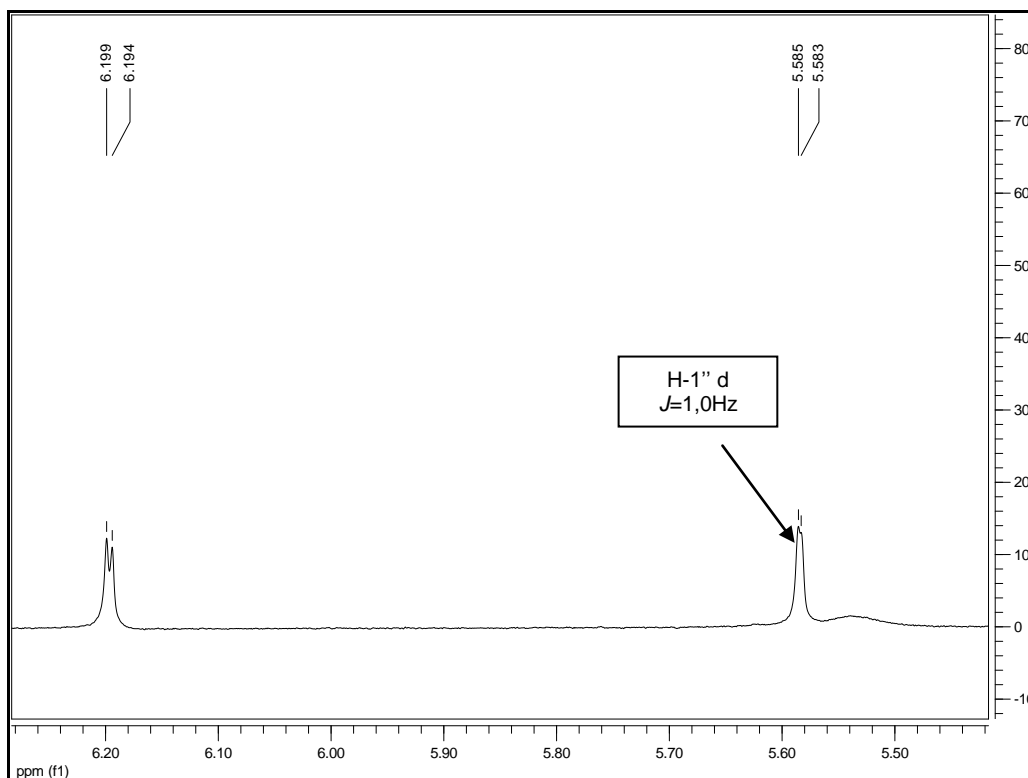


Figura 31 – Expansão do Espectro de RMN-¹H (5,5-6,20ppm) em DMSO-d₆ da Substância M3

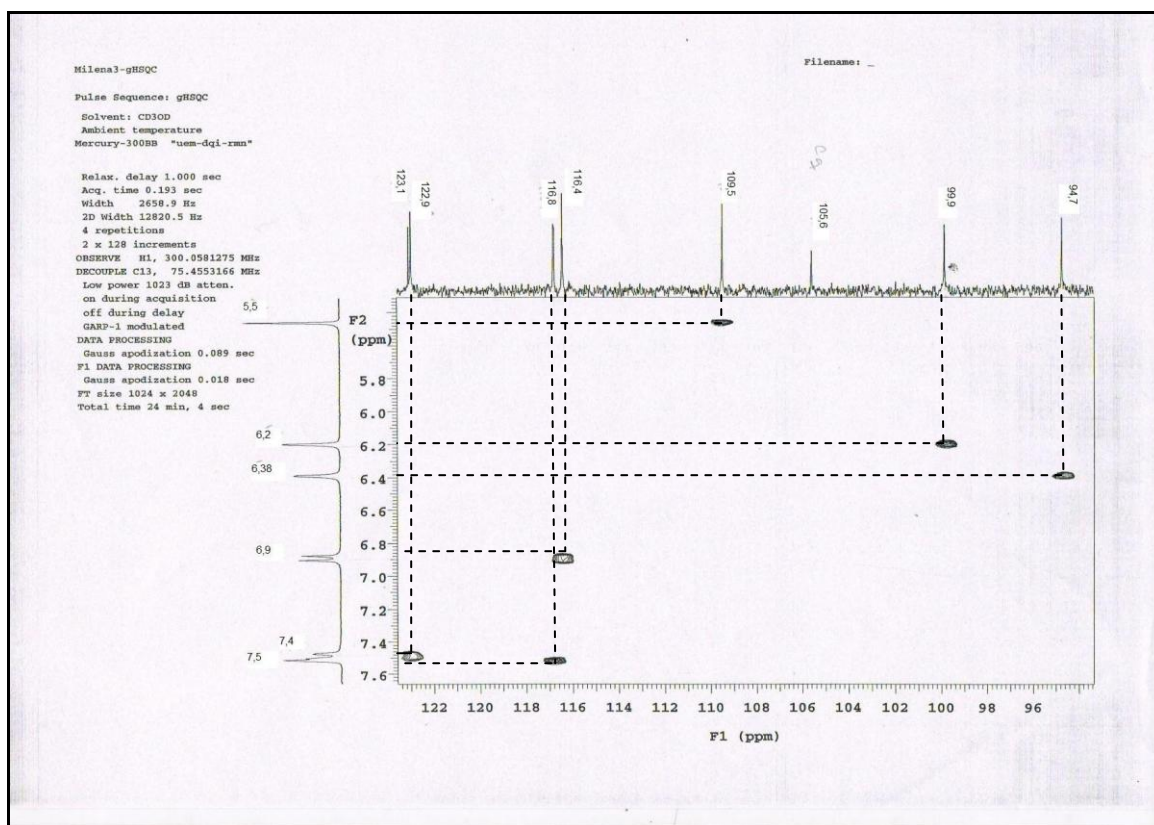


Figura 32 - Expansão do Espectro gHSQC (94-123ppm) da Substância M3

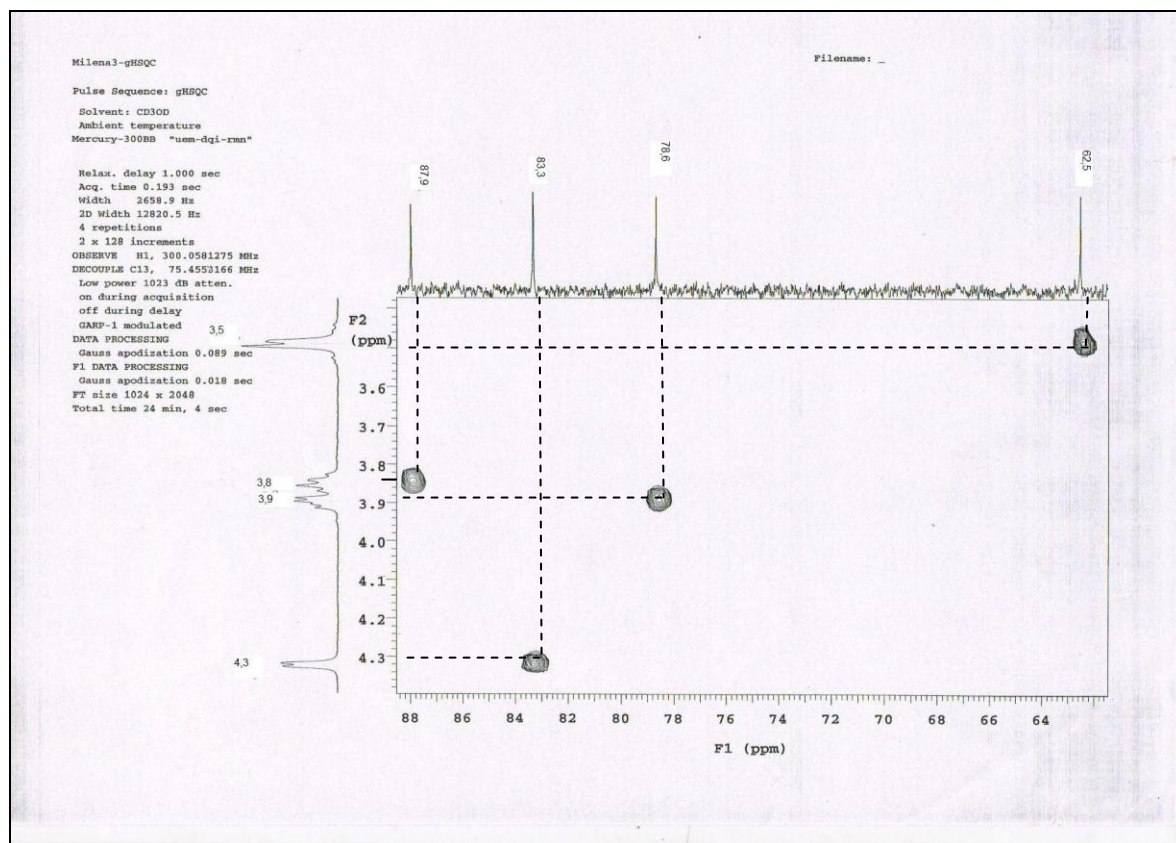


Figura 33 - Expansão do Espectro gHSQC (62-88ppm) da Substância M3

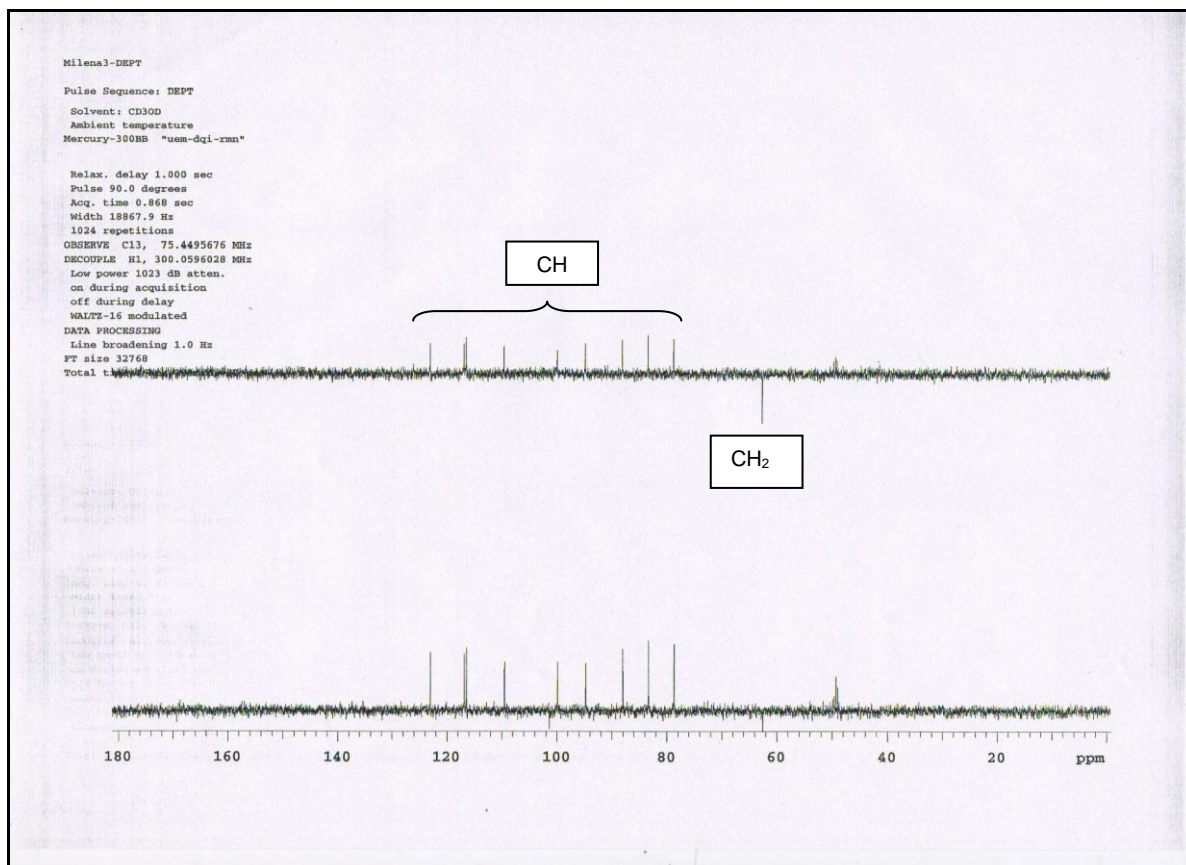


Figura 34 - Espectro DEPT da Substância M3

Os resultados obtidos foram comparados com dados da literatura, identificando o composto M3 como sendo a quercetina-3-O- α -arabinofuranosideo (figura 35). Esta substância foi isolada da espécie *Byrsocarpus coccineus*, Connaraceae, na fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas (AHMADU et al., 2007).

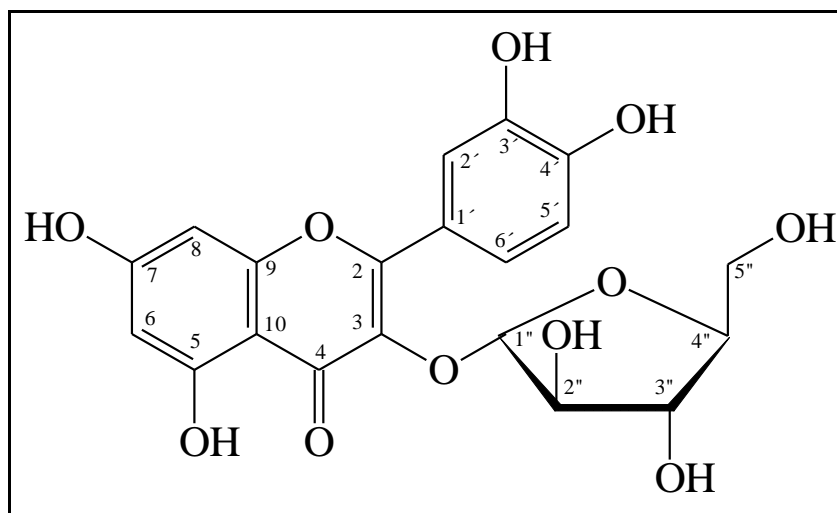


Figura 35 – Estrutura Química da Quercetina-3-O- α -arabinofuranosideo

5.3.4 Identificação da Substância M4

Foi obtida uma mistura de dois compostos, na qual provavelmente um é o composto M3 e o outro é um composto desconhecido M4. Com a mistura foram realizados todos os experimentos para identificação: UV, infravermelho e RMN, com os quais já foi possível identificar os compostos. Após tentativas de separação não foi possível obter o composto M4 totalmente puro, em todas as tentativas a presença de M3 foi confirmada sempre como composto majoritário, houve também perda de massa não possibilitando a identificação do composto puro.

Os espectros de UV para a mistura revelaram bandas muito semelhantes às obtidas para o UV do composto M3, em MeOH λ_{max} 355,5 e 257nm. Com NaOAc λ_{max} 371,5 e 272,5 nm, a adição de H_3BO_3 apresentou bandas em λ_{max} 375,5 e 261nm. Na presença de AlCl_3 λ_{max} 430 e 273,5nm, e adicionando-se HCl λ_{max} 400

e 270nm (figuras 36 e 37). Este resultado comprova a presença majoritária da quercetina-3-O- α -arabinofuranosídeo na mistura, as bandas do segundo composto foram encobertas.

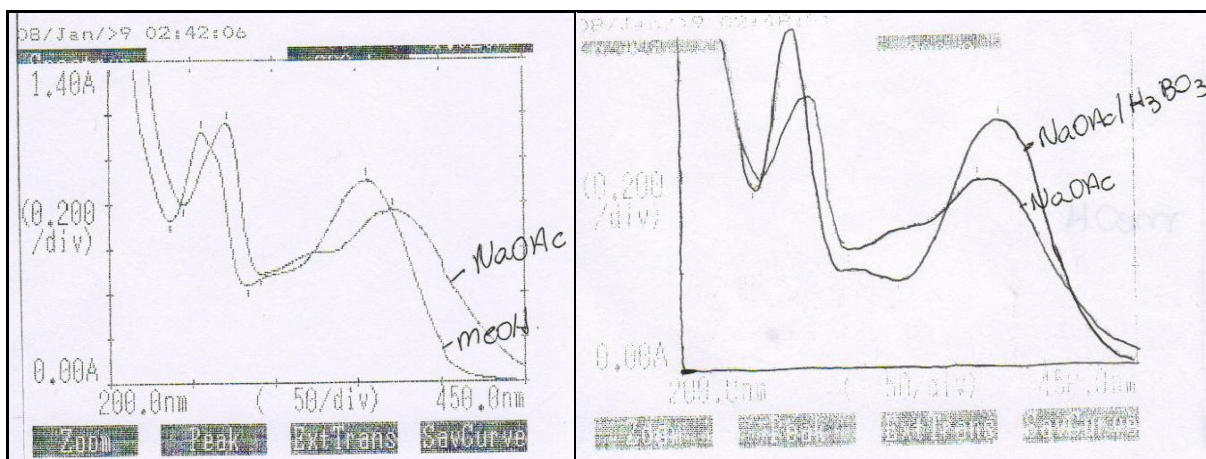


Figura 36 – Espectro de Absorção no UV da mistura M3 e M4 com NaOAc e H_3BO_3

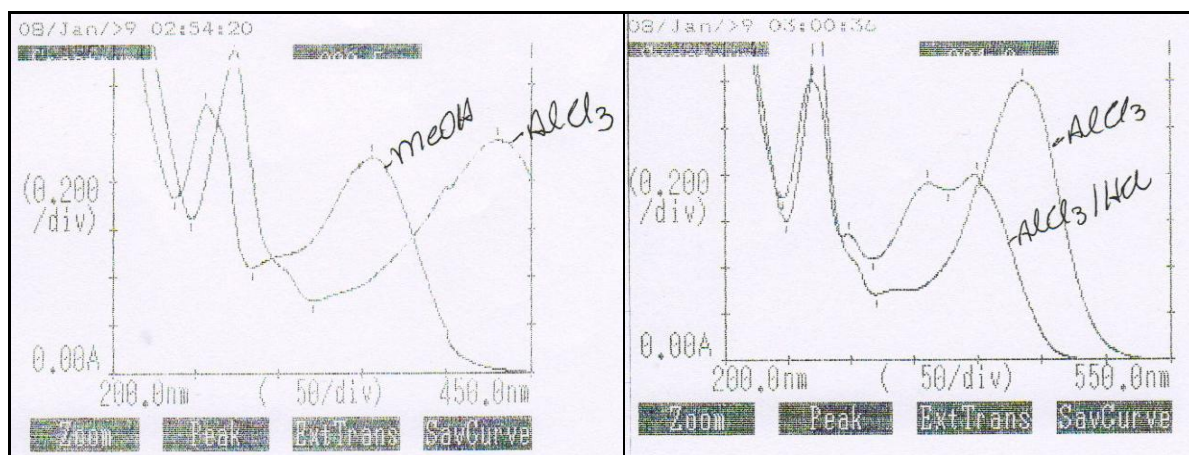


Figura 37 – Espectro de Absorção no UV da mistura M3 e M4 com $AlCl_3$ e HCl

No espectro de infravermelho (figura 38) as bandas obtidas revelaram valores semelhantes às bandas do composto M3, uma banda larga em 3419 e 3327 cm^{-1} característica da deformação axial do grupamento OH, uma banda em 1651 cm^{-1} relativa à presença de carbonila conjugada, bandas entre 1606 e 1360 cm^{-1} indicativas de C=C, e entre 1000 e 800 cm^{-1} representam as deformações angulares de C-H do anel aromático. Em aproximadamente 2974 cm^{-1} há uma banda indicativa da presença de ligação C-H sp^3 (SILVERSTEIN; BASSLER; e MORRIL 1994).

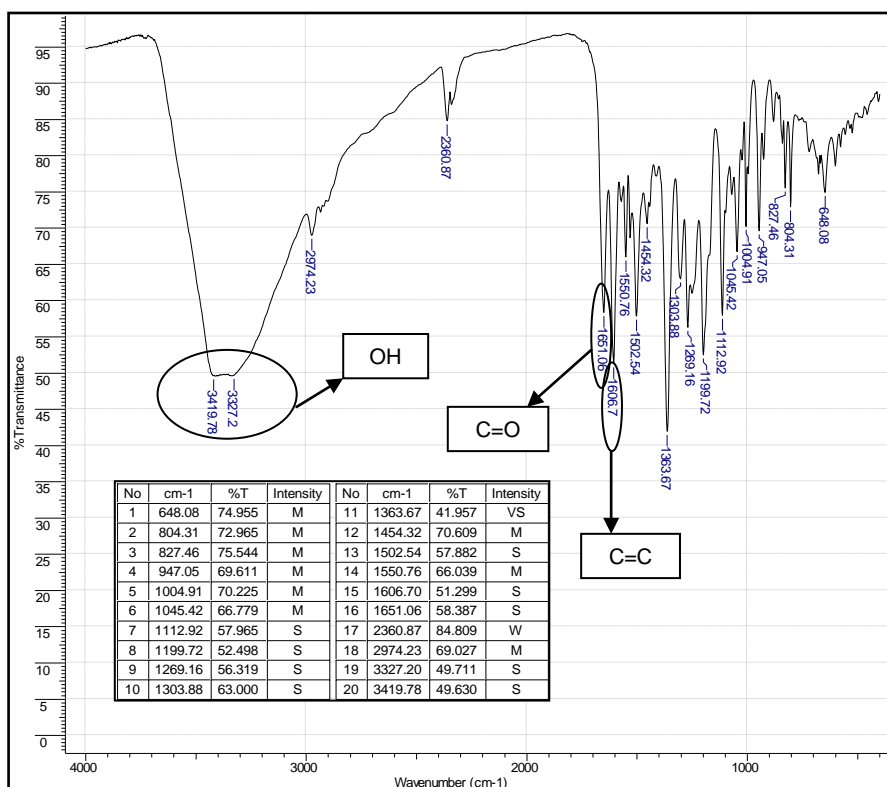


Figura 38 – Espectro de Absorção no Infravermelho da Mistura de M3 e M4

Os espectros de RMN da mistura foram feitos em solvente CD₃OD e apresentaram dois conjuntos de sinais muito próximos, indicando a presença de dois compostos, ambos derivados da quercetina e glicosilados na mesma posição. Os deslocamentos de RMN-¹³C apresentaram sinais na região de compostos aromáticos (110-160ppm) e de açúcares (60-80ppm) revelando um total de 31 carbonos (figura 39). Os sinais mais intensos apresentaram os mesmos valores dos deslocamentos químicos do composto M3, quercetina-3-O- α -arabinosideo. Subtraindo os sinais de M3 do espectro têm-se os sinais referentes ao segundo flavonóide (M4), o qual tem os mesmos deslocamentos químicos da aglicona, com alguns carbonos ligeiramente deslocados, a diferença está na unidade de açúcar. Os quatro deslocamentos de menor intensidade entre 60-80ppm e um em δ 104,5, referente ao carbono anomérico, indicam a presença de um açúcar diferente da arabinofuranose, que por comparação com dados da literatura foi identificado como xilose. A substituição em C-3 foi dada pelos deslocamentos em C-2 e C-3 quando comparados à quercetina, pois C-2 está desprotegido em torno de 10ppm e C-3

mais protegido em 3ppm. A tabela 8 apresenta os deslocamentos de RMN- ^{13}C comparados com a literatura de Lhuillier (2007) e Yan *et al* (2002).

Tabela 8 - Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN- ^{13}C da Mistura M3 e M4

Posição	M3 Experimental	LHUILLIER (2007)	M4 experimental	YAN <i>et al</i> (2002)
	^{13}C	^{13}C	^{13}C	^{13}C
2	158,5	158,2	158,5	152,0
3	134,9	133,7	135,4	130,0
4	180,0	178,8	179,4	179,5
5	163,1	161,8	163,1	162,0
6	99,8	98,9	99,8	100,1
7	166,0	164,8	166,0	166,3
8	94,7	93,5	94,7	94,9
9	159,3	157,4	158,5	158,6
10	105,6	104,4	105,6	100,1
1'	123,0	121,9	123,0	123,4
2'	116,4	115,7	115,9	116,2
3'	149,8	145,1	149,8	143,0
4'	146,3	148,7	146,1	146,0
5'	116,8	115,3	117,2	117,4
6'	122,9	121,8	123,3	123,2
	<i>Arabinofuranose</i>		<i>Xilose</i>	
1''	109,4	108,5	104,5	104,7
2''	83,3	82,1	75,3	75,4
3''	78,6	77,5	77,5	77,7
4''	87,9	86,8	71,0	71,2
5''	62,5	61,4	67,2	67,4

O espectro de RMN- ^1H desta mistura apresentou os sinais entre 6-8ppm (região aromática) e 3-4,2ppm (região de açúcares). Os hidrogênios em δ 7,5 (H6'), δ 7,4 (H2') e δ 6,87 (H5') referentes ao anel B, δ 6,2 (H6) e δ 6,39 (H8) para o anel A são substância M3. Para a substância M4 foram obtidos sinais de menor intensidade em δ 7,6 (H2'), δ 7,57 (H6') e δ 6,84 (H5') para o anel B, δ 6,39 (H8) e δ 6,16 (H6) para o anel A, confirmando que ambos são derivados da quercetina (figura 40). Os hidrogênios anoméricos foram identificados como um singlete em δ 5,46 para M3 e para M4 um dubleto em δ 5,17 com $J=7,2\text{Hz}$, constante de acoplamento que confirma a configuração β para a xilose (figura 41) (YAN *et al.*, 2002). Não foi

possível fazer a correlação exata entre carbono e hidrogênio do composto M4, pois devido a pequena quantidade deste composto na mistura não apareceram sinais no experimento gHSQC, portanto a identificação foi feita apenas por comparação com dados da literatura (YAN *et al.*, 2002; AQUINO *et al.*, 2001).

A tabela 9 mostra os valores de RMN-1H com comparação de dados de Lhuillier (2007) e Yan *et al.* (2002).

Tabela 9 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN-¹H da Mistura M3 e M4

Posição	M3 Experimental	LHUILLIER (2007)	M4 Experimental	YAN <i>et al.</i> (2002)
	¹ H	¹ H	¹ H	¹ H
2	-	-	-	-
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	6,2 d(J=1,8Hz)	6,21 d(J=2,0Hz)	6,16 d(J=2,1Hz)	6,20
7	-	-	-	-
8	6,39 d(J=1,8Hz)	6,4 d(J=2,0Hz)	6,39 d(J=1,8Hz)	6,39
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
1'	-	-	-	-
2'	7,4 d(J=2,1Hz)	7,54 d(J=2,1Hz)	7,6	7,6
3'	-	-	-	-
4'	-	-	-	-
5'	6,88	6,92 d(J=8,3Hz)	6,84 s	6,85
6'	7,5 dd(J=2,1; 5,4Hz)	7,5 dd(J=8,3 e 2,1Hz)	7,57 d(J=2,1Hz)	7,57
Arabinofuranose		Xilose		
1''	5,46 s	5,48 d(J=1,0Hz)	5,17 d(J=7,2Hz)	5,18 d(J=6Hz)
2''	4,3 d(J=2,1Hz)	4,35 dd(J=3,0; 1,0Hz)	3,39 m	3,4 d
3''	3,8 dd(J=4,2; 8,4Hz)	3,93 dd(J=5,0; 3,0Hz)	3,46-3,54	3,34 s
4''	3,9 dd(J=5,0; 3,0Hz)	3,89 m	3,46-3,54	3,45-3,54 m
5''	3,5 m (2H)	3,52 dd(J=11,5; 4,0Hz)	3,1 dd(J=11,5; 9,5Hz)	3,10 dd
		3,48 dd(J=11,5; 3,6Hz)	3,78 dd(J=11,4; 5,0Hz)	3,76 dd

Nota: d=dubeto, dd=duplo dubeto, s= singeto, m= multipeto, J= constante de acoplamento

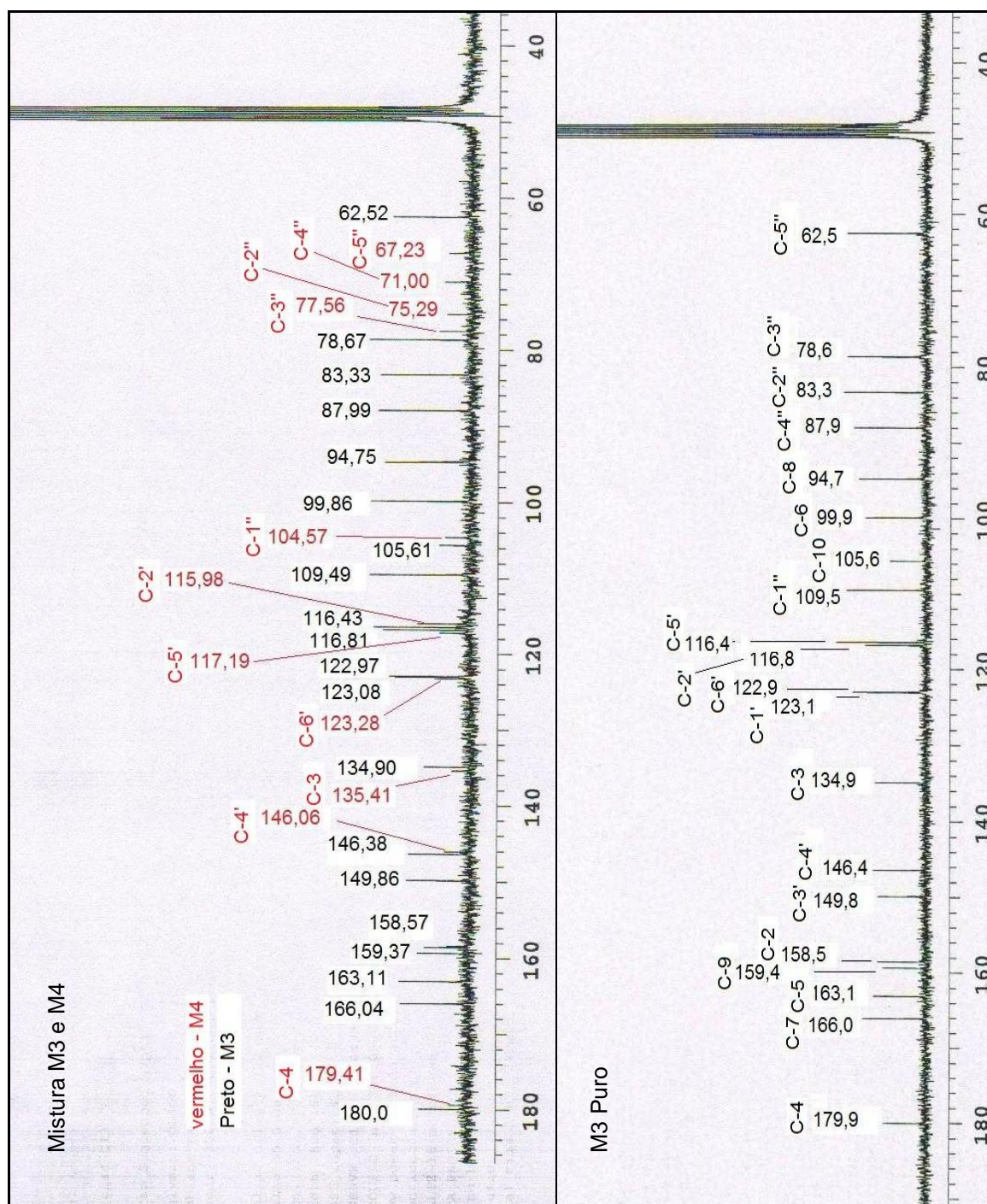


Figura 39 – Comparação do Espectro de RMN- ^{13}C da Mistura M3 e M4 com o Espectro de RMN- ^{13}C do Composto M3 Puro.

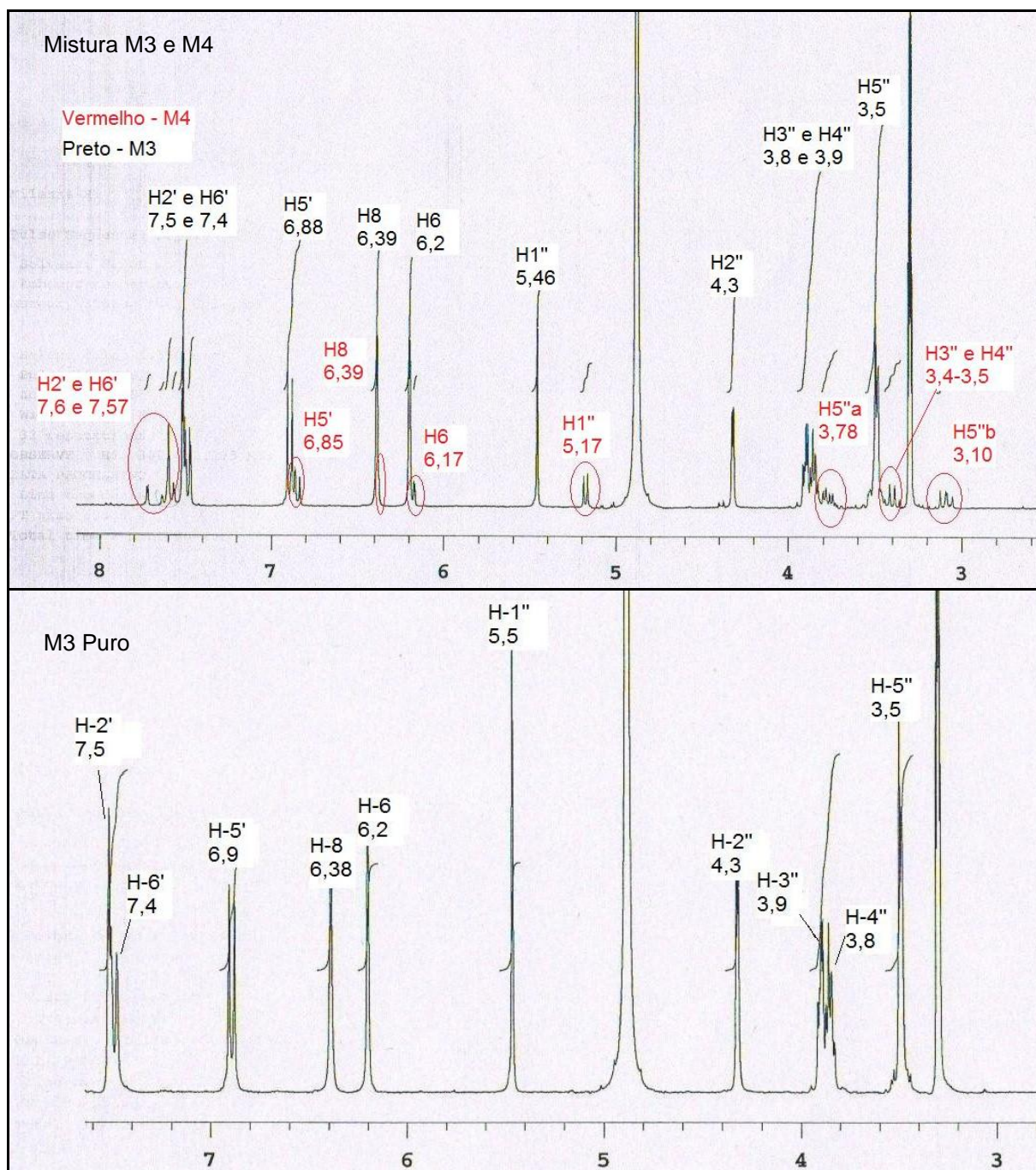


Figura 40 – Comparação do Espectro de RMN- ^1H da Mistura de M3 e M4 com o Espectro de RMN- ^1H do Composto M3 Puro

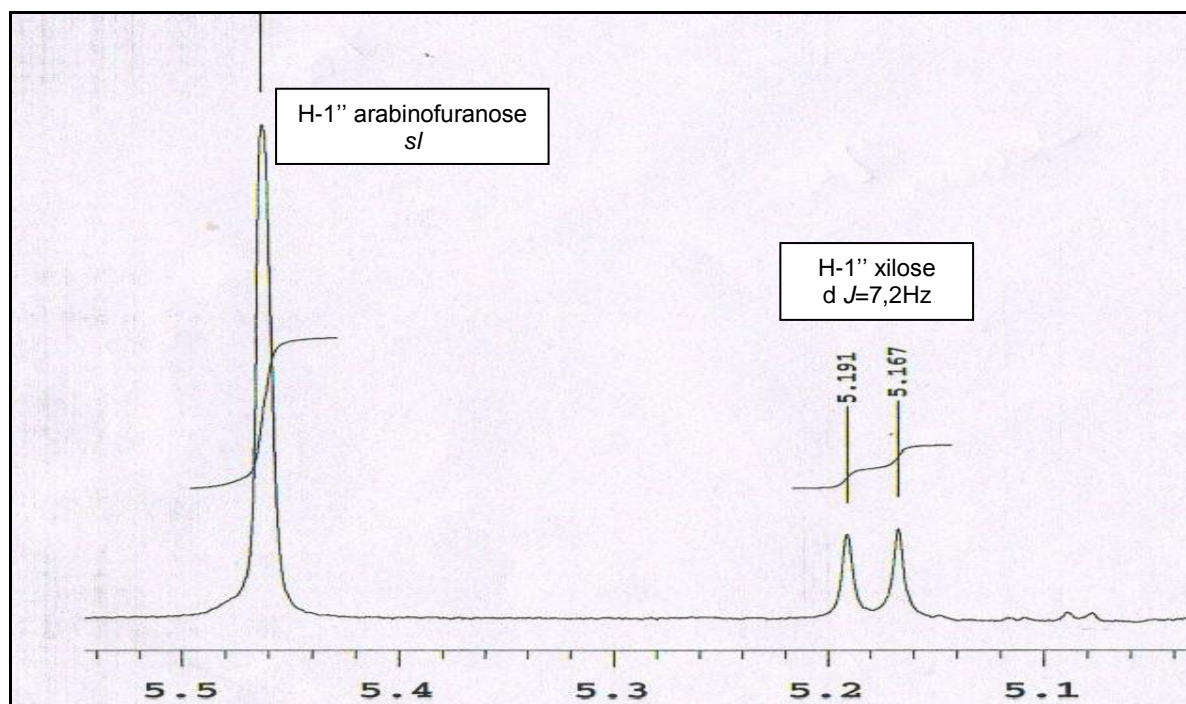


Figura 41 – Expansão do Espectro de RMN- ^1H (5,1 – 5,5ppm) da Mistura M3 e M4

Analisando o espectro de RMN- ^1H pode-se calcular a quantidade de cada composto na mistura através da integral dos hidrogênios anoméricos, sendo M3 correspondente a 75%, e M4 a 25% da mistura. Com comparação dos dados da literatura propõe-se que o composto M4 é a quercetina-3-O- β -xilosideo, cuja estrutura química é ilustrada na figura 42.

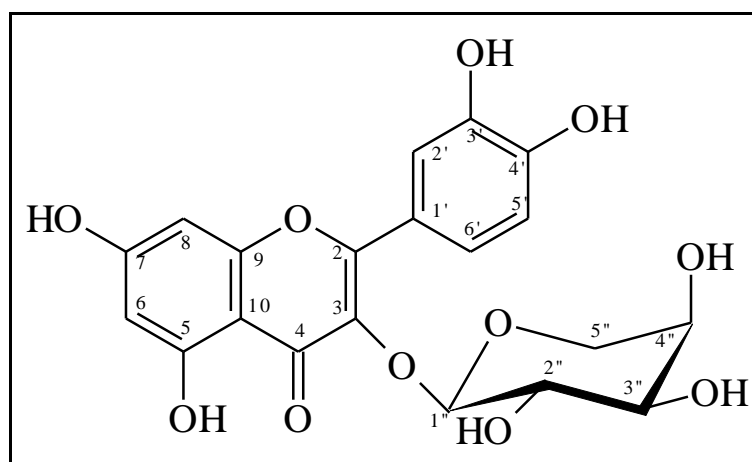


Figura 42 – Estrutura Química da Quercetina-3-O- β -xilosideo

5.3.5 Identificação Substância M5

Esta substância se apresentou também como um pó amorfo com um ponto de fusão de 230°C. O espectro de absorção no infravermelho para M5 (figura 43) revelou duas bandas de absorção em 3429 e 3244 cm^{-1} típicas da deformação axial da ligação OH, a existência de anel aromático pode ser observada pela presença de um conjunto de bandas entre 1606 e 1508 cm^{-1} , referentes à deformação axial de C=C aromático. Uma banda em 1656 cm^{-1} sugere a presença de carbonila (SILVERSTEIN; BASSLER e MORRIL, 1994).

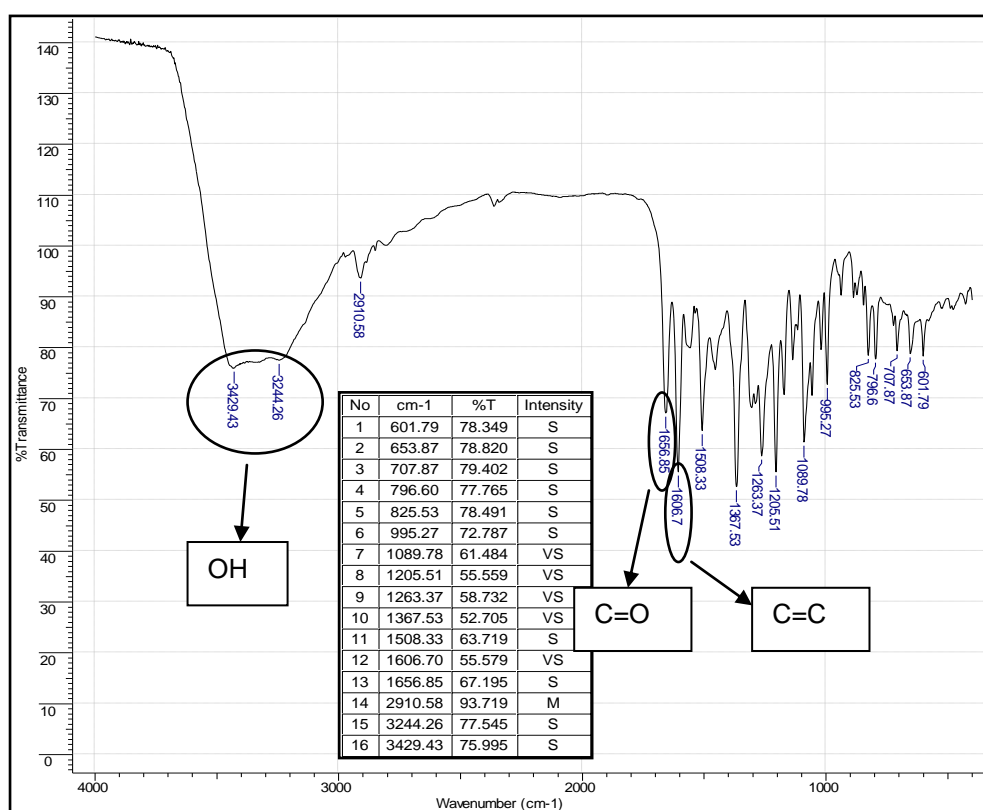


Figura 43 - Espectro de Absorção no Infravermelho da Substância M5

A absorção no UV indicou também um comportamento característico de flavonóides (figuras 44 e 45). O espectro original foi obtido em metanol, revelando bandas de absorção em (λ_{max}): 257,9; 269(ombro) e 359,5nm, características aos anéis A (256-259nm) e B (348-360nm).

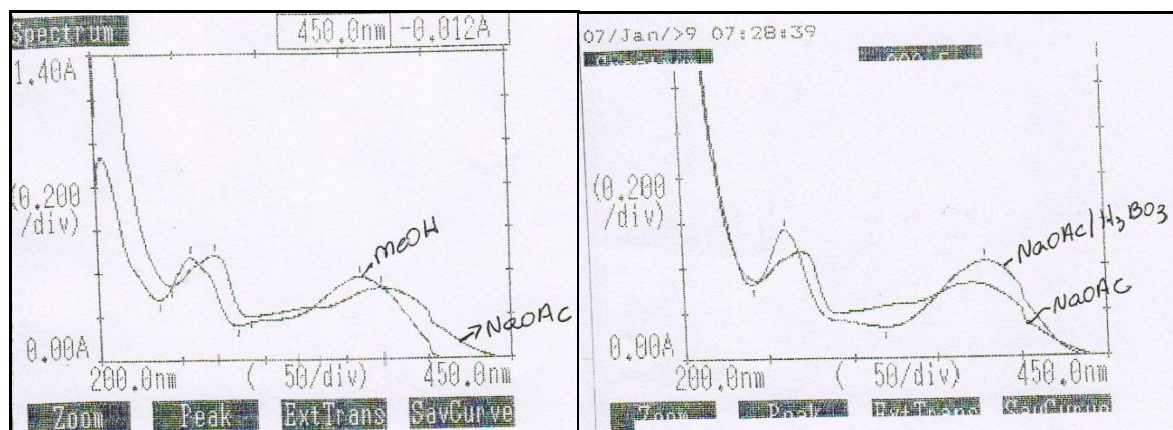


Figura 44 - Espectro de Absorção no UV da Substância M5 com NaOAc e H_3BO_3 .

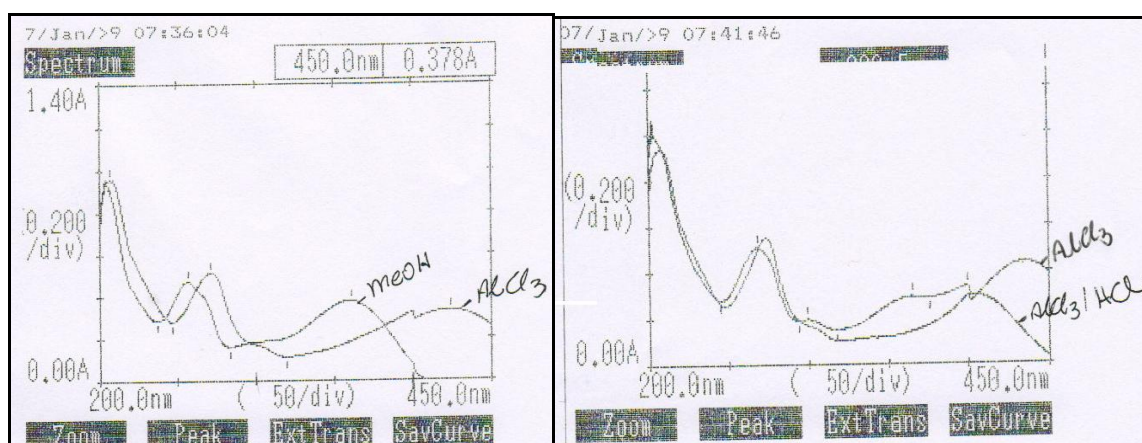


Figura 45 - Espectro de Absorção no UV da Substância M5 com $AlCl_3$ e HCl.

A banda I sofreu um deslocamento hipsocrômico (13,5nm) em relação a quecetina devido à substituição em C-3 (SANTOS, SCHRIPEMA e KUSTER, 2005). Em presença de NaOAc houve um deslocamento batocrômico de 13,6nm da banda II (λ_{max} 271,5; 372,5nm), indicando a presença de hidroxila livre em C-7 e ausência destas em C-6 e C-8. Com a adição de ácido bórico ocorreu deslocamento batocrômico de 20nm da banda I (λ_{max} 379,5; 262nm), característico da presença de grupamento ortodihidroxila em C-3' e C-4' no anel B.

O espectro com AlCl_3 revelou absorções em (λ_{max}) 272; 304 (ombro); 424,5nm, com deslocamento batocrômico das duas bandas, e com adição de HCl (λ_{max}) 269; 299,5(ombro); 400nm. Pode-se observar o deslocamento hipsocrômico da banda I entre esses dois espectros, confirmando a presença do grupamento ortodihidroxila C-3' e C-4' no anel B. Em relação ao espectro original o deslocamento batocrômico da banda I, após adição de HCl, foi de 40,5nm, referente ao grupamento 5-hidroxila com a posição 3 substituída.

O espectro de RMN ^{13}C , obtido em 75 MHz, com solvente DMSO-d_6 , revelou a presença de um total de 21 carbonos, destes 15 carbonos correspondem à região aromática de espectros de flavonóides, e seis carbonos na região dos açúcares, de 80-60ppm (figura 46).

Os deslocamentos de RMN- ^1H apresentaram sinais entre 6-8ppm, região aromática, e entre 3-4,2ppm referente ao açúcar (figuras 47, 48 e 49). Os sinais de ^1H em δ 6,8 (H5'), δ 7,5 (H2') e δ 7,65 (H6'), do anel B, e o sinais em δ 6,2 (H6) e δ 6,4 (H8) do anel A, indicam que o composto é um derivado glicosilado da quercetina.

A posição do açúcar foi identificada em C-3 devido ao deslocamento que ocorreu em C-2 e C-3 quando comparados à quercetina, que não possui substituição. Neste composto C-2 está deslocado em 10ppm, está mais desprotegido, e C-3 está protegido em 4ppm, esses deslocamentos ocorrem com substituição nesta posição, e os demais carbonos apresentam os deslocamentos químicos semelhantes ao de quercetina. Através da comparação com espectros da literatura definiu-se o açúcar como sendo a galactose (JIAN-QIN, 1990; VVDENSKAYA *et al.*, 2004).

O hidrogênio anomérico (H1'') em δ 5,39 com um $J=7,8\text{Hz}$ (figura 50) definiu a configuração como beta, pois para ligação alfa a constante de acoplamento seria em torno de 3Hz (SANTOS, SCHRIPEMA e KUSTER, 2005).

As correlações entre carbonos e hidrogênio foram dadas pelo experimento HMQC (figura 51) e pelo DEPT observou-se a presença de 10 grupos CH e um CH_2 (figura 52).

A tabela 10 apresenta os resultados de RMN- ^{13}C e RMN- ^1H com comparação dos dados da literatura de Jian-Qin *et al.* (1990) e Vvdenskaya *et al.* (2004).

Tabela 10 – Deslocamentos Químicos (ppm) de RMN-¹³C e RMN-¹H da Substância M5

Posição	Experimental		JIAN-QIN <i>et al.</i> (1990)		VVDENSKAYA <i>et al.</i> (2004)	
	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H	¹³ C	¹ H
2	156,2	-	156,28	-		-
3	133,5	-	133,61	-		-
4	177,5	-	177,44	-		-
5	161,3	-	161,15	-		-
6	98,7	6,2 <i>d</i> (<i>J</i> =1,8Hz)	98,62	6,20 <i>s</i>	99,4	6,04
7	164,2	-	164,02	-		-
8	93,5	6,4 <i>d</i> (<i>J</i> =2,1Hz)	93,45	6,41 <i>s</i>	94,8	6,23
9	156,3	-	156,28	-		-
10	103,9	-	103,94	-		-
1'	121,1	-	121,16	-		-
2'	115,9	7,5 <i>d</i> (<i>J</i> =2,4Hz)	115,17	7,53 <i>s</i>	117,1	7,59
3'	144,9	-	144,67	-		-
4'	148,5	-	148,32	-		-
5'	115,2	6,8 <i>d</i> (<i>J</i> =8,7Hz)	116,10	6,82 <i>d</i> (<i>J</i> =8Hz)	116,1	6,79
6'	122,1	7,65 <i>dd</i> (<i>J</i> =8,4; 2,1Hz)	121,62	7,67 <i>d</i> (<i>J</i> =8Hz)	122,7	7,39
OH-5		12,62 <i>s</i>		12,64 <i>s</i>		
OH-7		10,87 <i>s</i>		10,9 <i>s</i>		
OH-4'		9,74 <i>sl</i>		9,76 <i>s</i>		
OH-3'		8,17 <i>s</i>		9,19 <i>s</i>		
<i>Galactopirranose</i>						
1''	101,8	5,39 <i>d</i> (<i>J</i> =7,8Hz)	102,12		103,1	4,97
2''	71,2	3,55 <i>dt</i> (<i>J</i> =7,8; 3,9Hz)	71,26		71,8	3,59
3''	73,2	3,33	73,27		73,3	3,43
4''	67,9	3,64 <i>sl</i>	67,93		68,6	3,69
5''	75,9	3,30 <i>s</i>	75,73		75,8	3,36
6''	60,2	3,25 e 3,45 (2H)	60,14		60,9	3,34 e 3,44
OH-2''		5,14 <i>d</i> (<i>J</i> =4,2Hz)		5,14 <i>sl</i>		
OH-3''		4,87 <i>d</i> (<i>J</i> =4,2Hz)		4,87 <i>sl</i>		
OH-4'',6''		4,44 <i>sl</i> (2H)		4,46 e 4,45 <i>sl</i>		

Nota: d= duplete, dd= duplo duplete, s= singleto, sl= singleto largo, dt=duplo tripleto, m= multiplete, *J*= constante de acoplamento

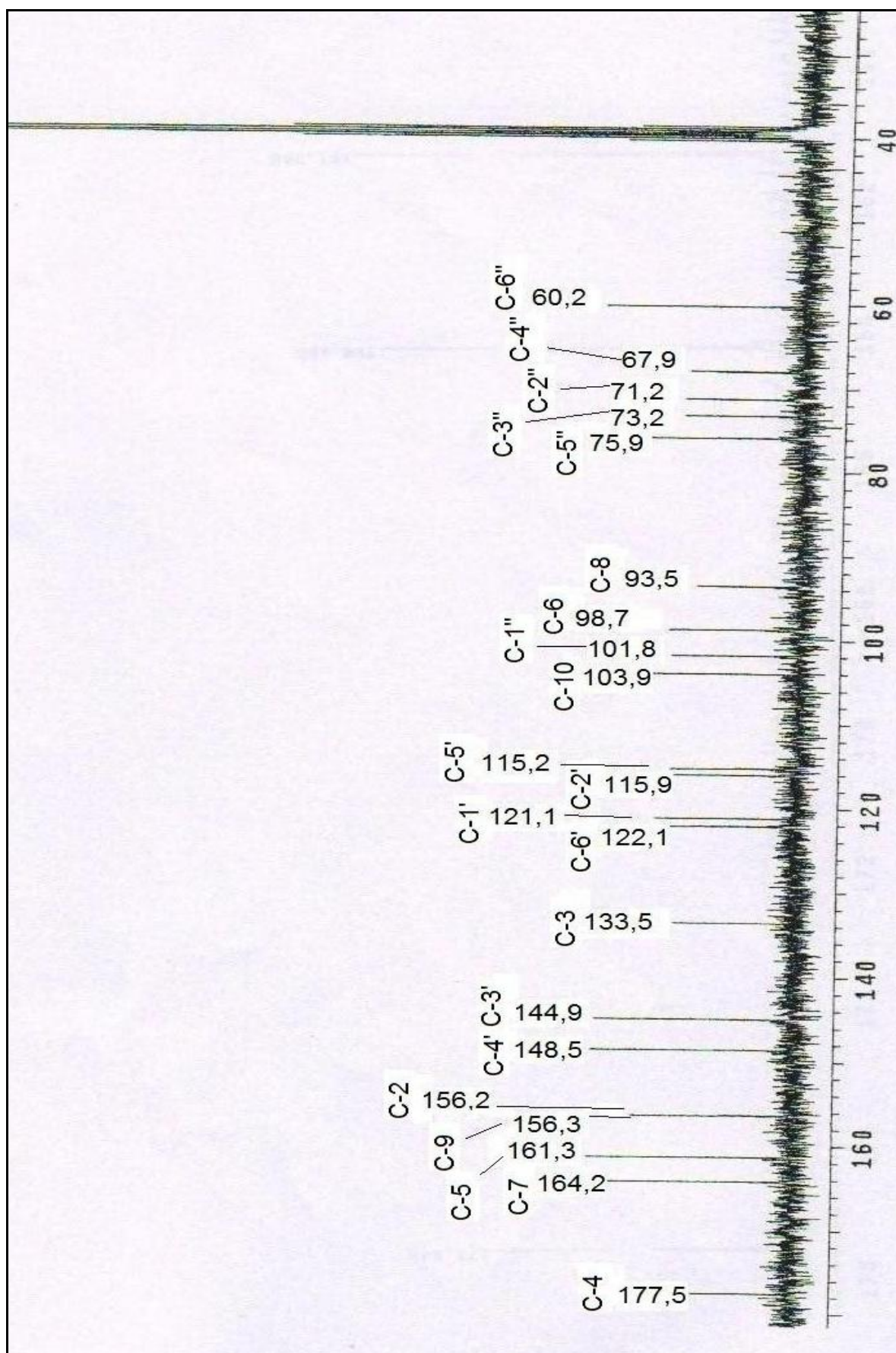


Figura 46 - Espectro de RMN- ^{13}C da Substância M5

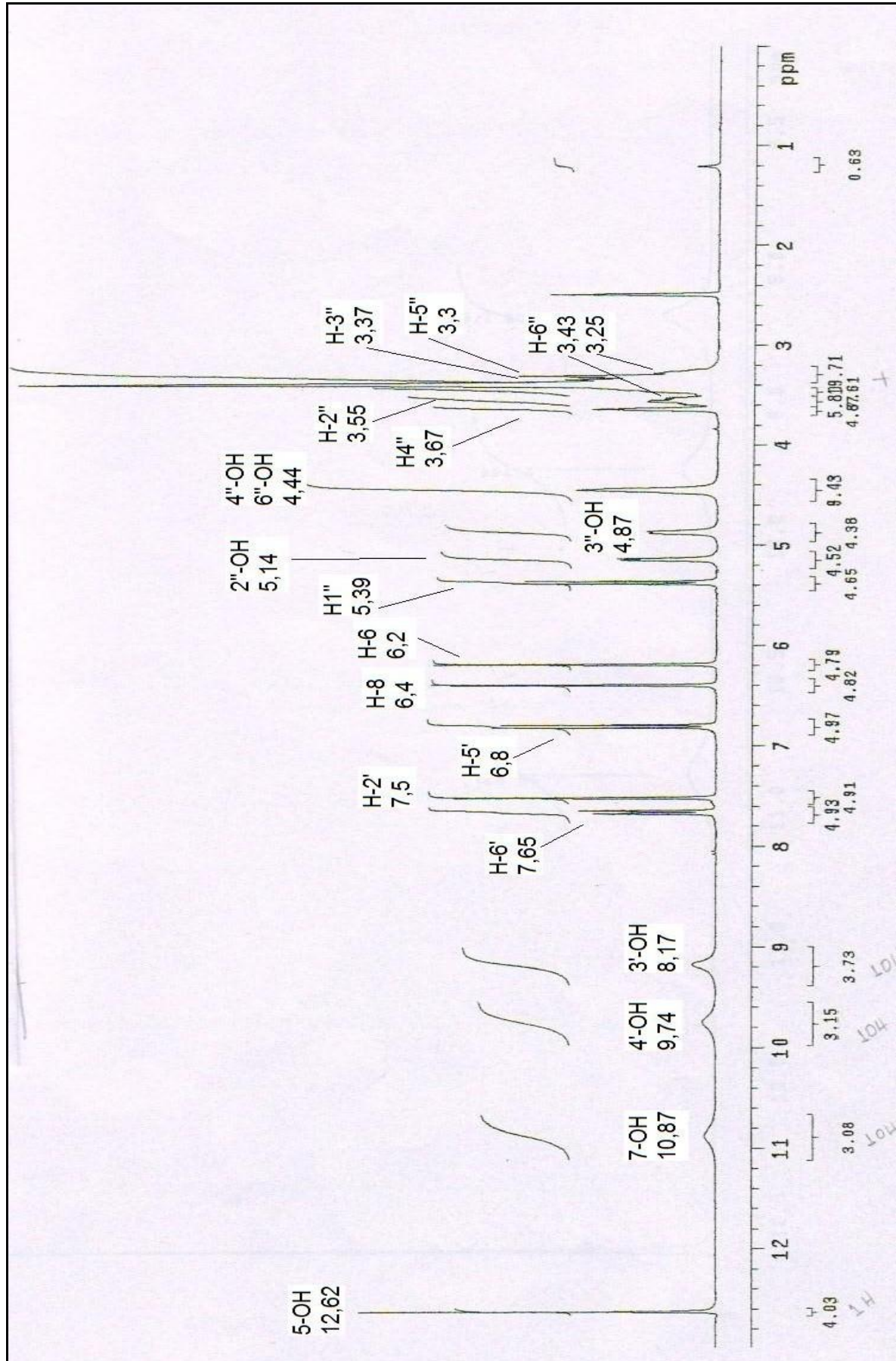


Figura 47 - Espectro de RMN-1H da Substância M5

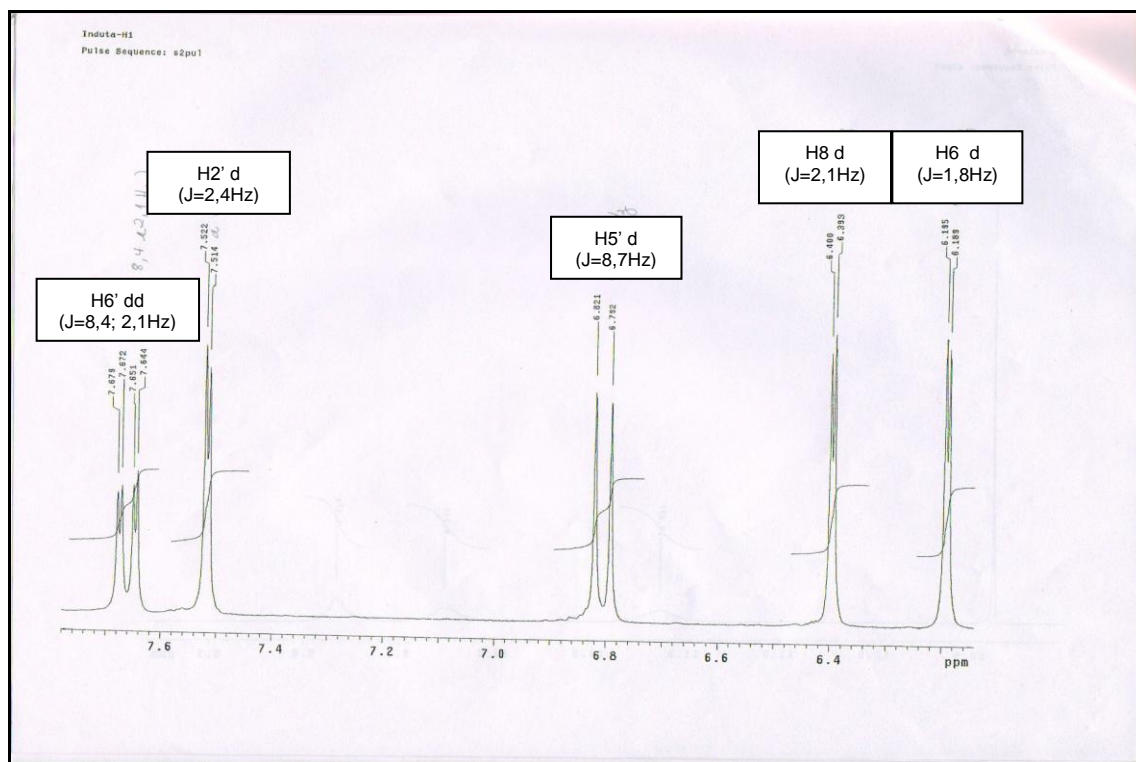


Figura 48 – Expansão do Espectro de RMN-¹H (6,2 – 7,7ppm) da Substância M5

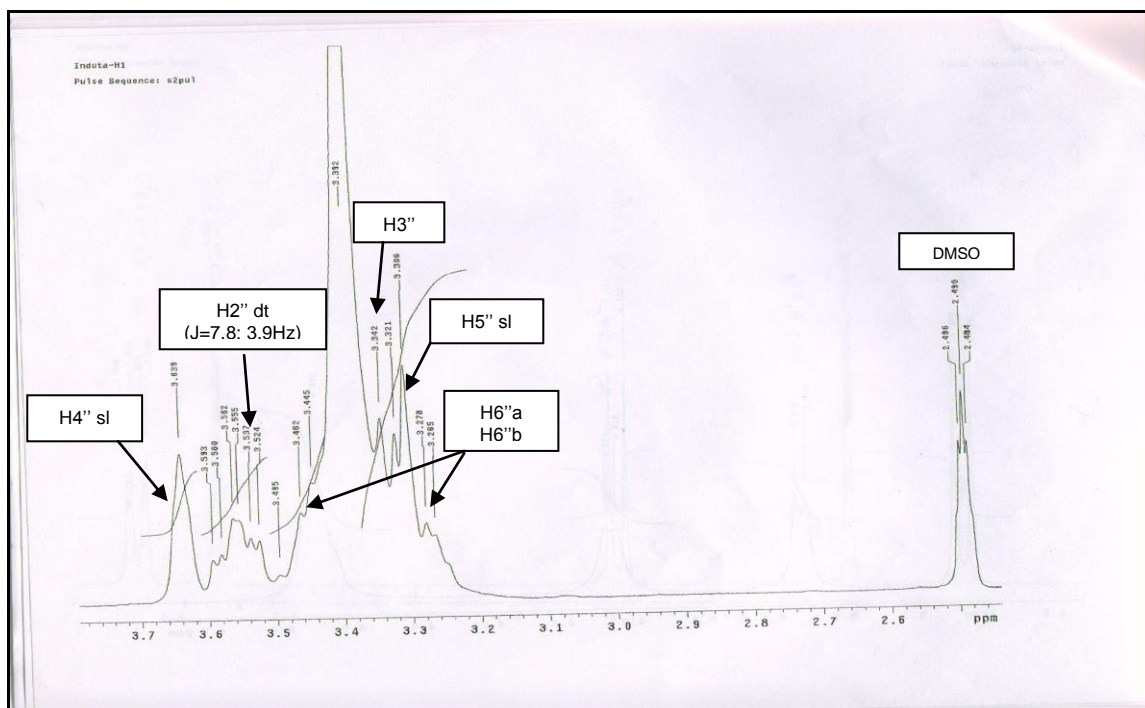


Figura 49 – Expansão do Espectro de RMN-¹H (2,5 – 3,7ppm) da Substância M5

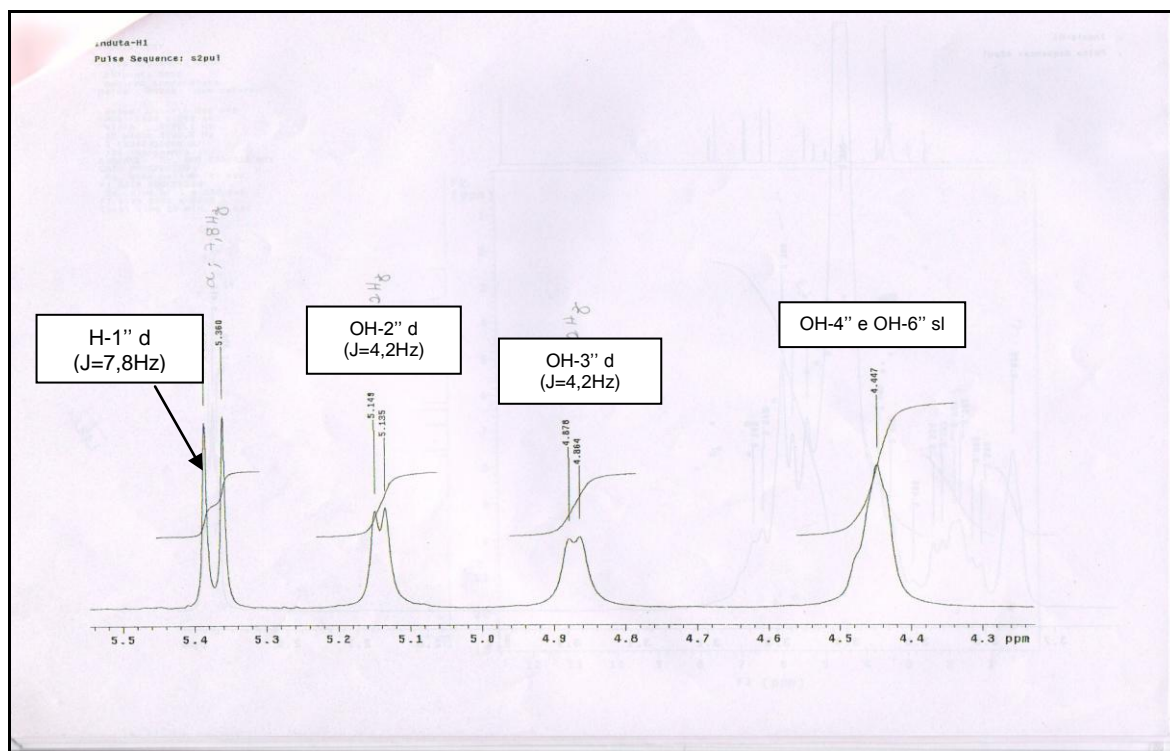


Figura 50 – Expansão do Espectro RMN-¹H(4,3-5,5ppm) da Substância M5

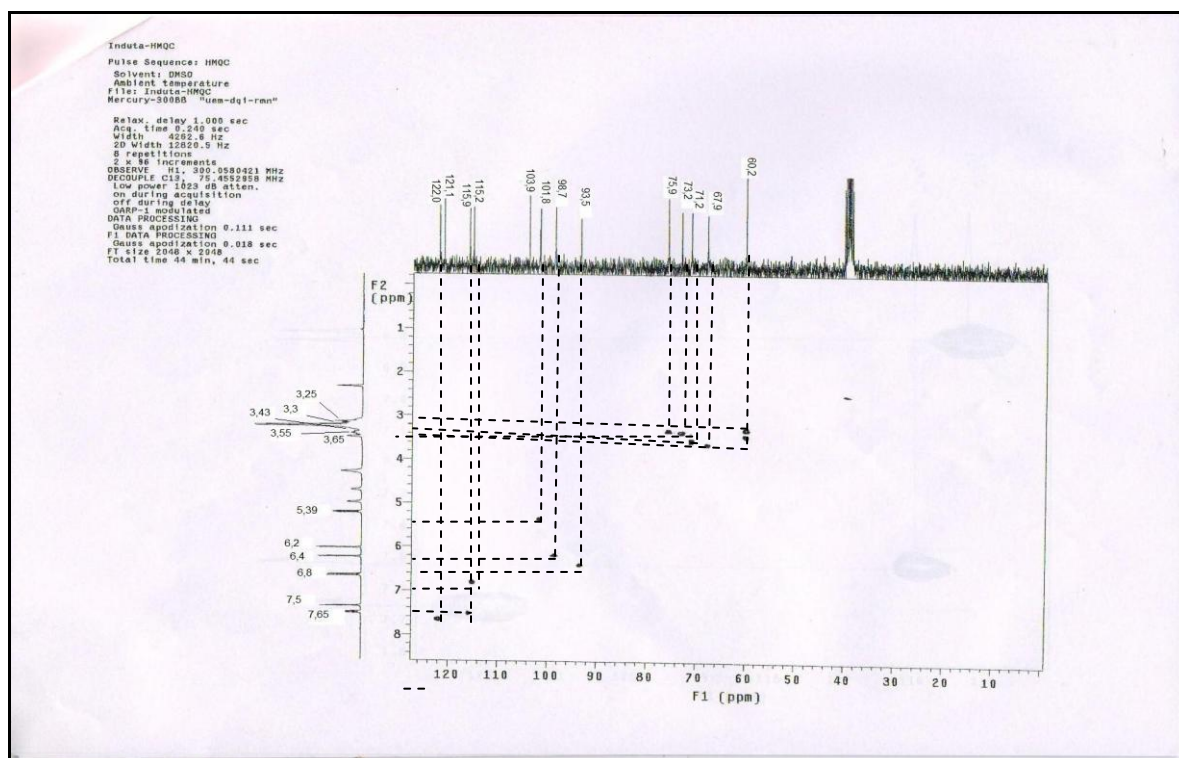


Figura 51 - Espectro HMQC da Substância M5

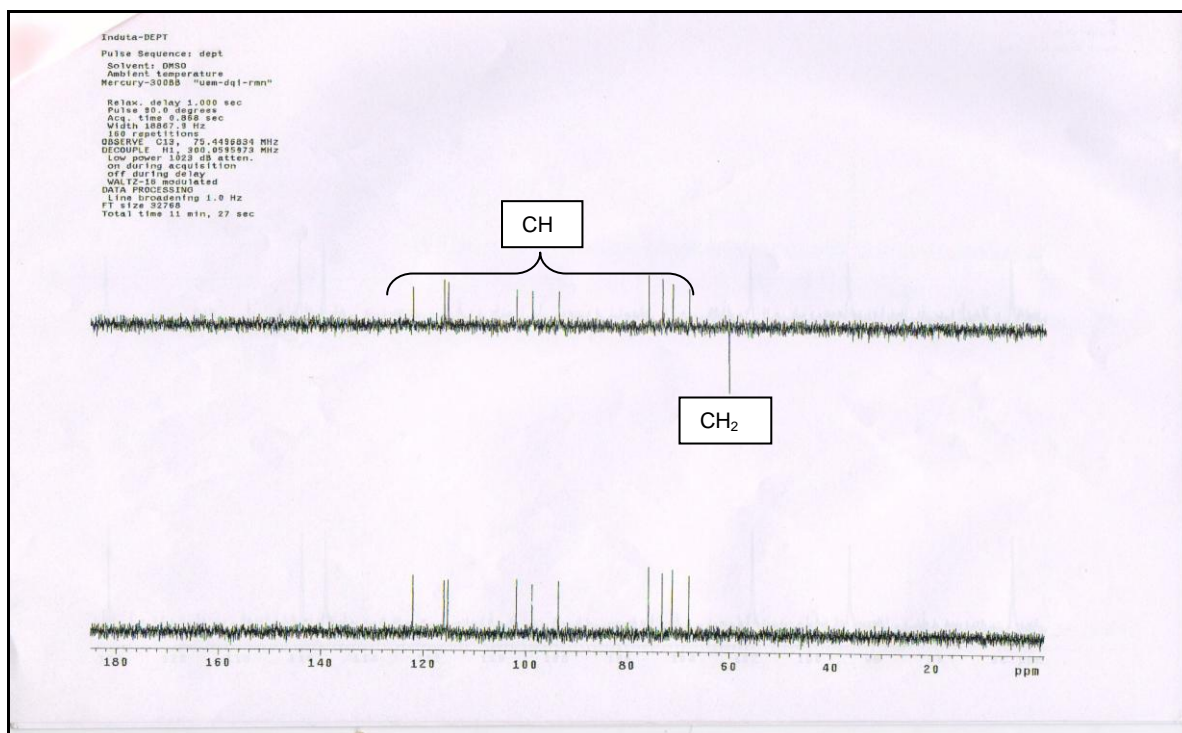


Figura 52 - Espectro DEPT da Substância M5

Por comparação dos dados obtidos e os dados das literaturas propõe-se a estrutura deste flavonóide como quercetina-3- β -D-galactopiranosídeo (quercetina-3-O- β -galactosídeo), conhecido também como hiperina (figura 53). Este composto já foi isolado anteriormente na espécie *Rourea microphylla* Planch, da família Connaraceae (JIAN-QIN *et al*, 1990).

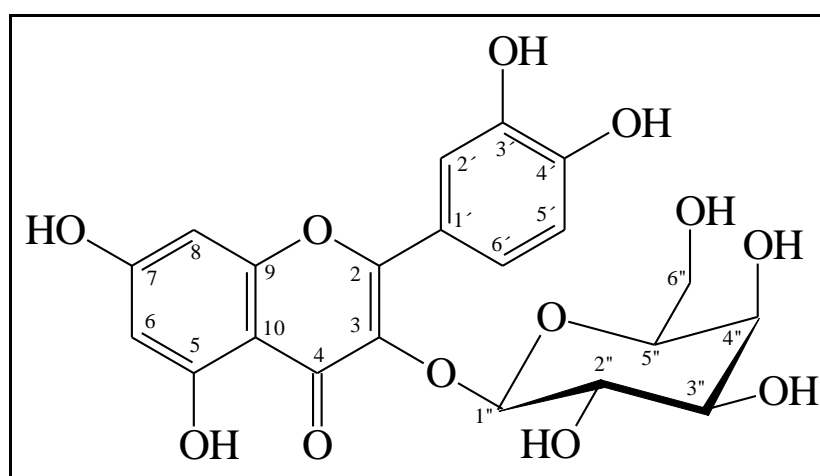


Figura 53 - Estrutura Química da Hiperina

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante (capacidade ou potencial antioxidante) é um parâmetro vastamente utilizado para caracterizar diferentes materiais naturais (frutas, vegetais, vinhos, chás). Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra potenciais efeitos danosos de processos ou reações que causam oxidação excessiva, envolvendo espécies reativas de oxigênio (ARNAO, 2000). Um antioxidante biológico é definido como “qualquer substância que, presente em baixas concentrações comparado ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato” (BENZIE, 1996). São substâncias que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia, além de prevenirem ou repararem danos ocasionados a célula pelas espécies reativas de oxigênio (ANDRADE *et al.*, 2007).

5.4.1 Ensaio pelo Método da Redução do Complexo do Fosfomolibdênio

Este método fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de determinadas substâncias com capacidade antioxidante, com formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, determinado espectrofotometricamente a 695nm.

A atividade antioxidante de cada amostra (frações hexano 1 e 2, clorofórmio, acetato de etila, n-tetracosano e hiperina) foi calculada em relação à vitamina C e à rutina, atividades consideradas 100%. Os resultados encontrados são mostrados na tabela 11.

Tabela 11 – Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio

Amostra	Atividade Antioxidante em relação à rutina (%)	Atividade Antioxidante em relação à vitamina C (%)
Fração Hexano 1	32,03	6,58
Fração Hexano 2	106,98	32,45
Fração Clorofórmio	249,39	77,96
Fração Acetato de Etila	196,68	61,49
Hiperina	127,80	42,34
n-Tetracosano	23,67	7,18

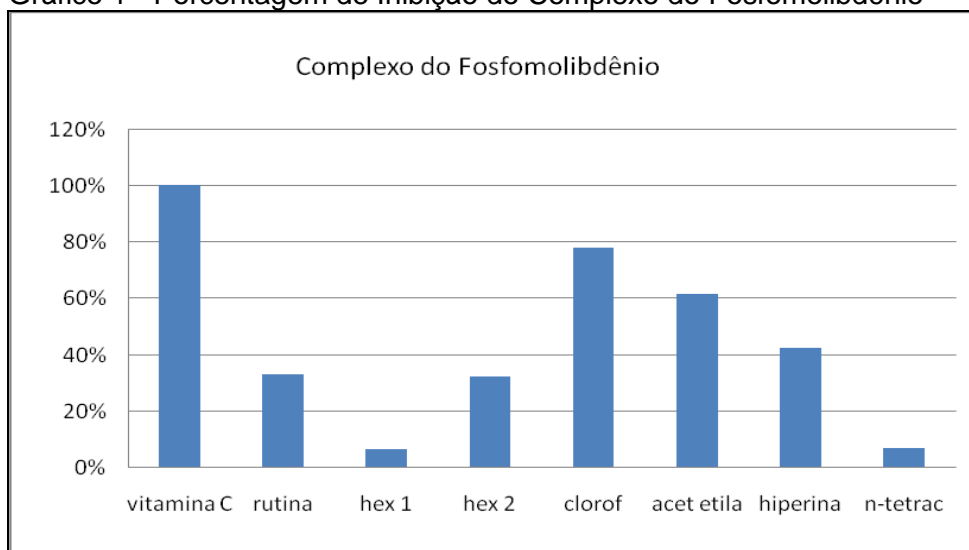
De acordo com os dados obtidos é possível concluir que todas as frações testadas, assim como as duas substâncias (hiperina e n-tetracosano), apresentam atividade antioxidante por redução do complexo do fosfomolibdênio. Considerando as atividades da rutina e vitamina C como referências as frações acetato de etila e clorofórmio demonstraram maior atividade, em torno de 70% da atividade da vitamina C, e quando comparados à rutina se mostraram mais ativas que este padrão. Desta forma essas frações podem ser consideradas antioxidantes em potencial. Este resultado era esperado devido a maior concentração de compostos fenólicos, que tem potencial antioxidante, nessas frações, como foi observado no ensaio fitoquímico preliminar.

A substância hiperina, isolada na fração acetato de etila, demonstrou uma atividade antioxidante expressiva, mas menor do que a fração que lhe deu origem. Isso se deve ao fato da fração ser uma mistura de substâncias que atuam em conjunto, tendo maior capacidade de redução do complexo fosfomolibdenico do que a substância isolada.

A fração hexano 2 também apresentou uma atividade antioxidante pronunciada, próxima à rutina. Já a fração hexano 1 e o n-tetracosano, isolada desta fração, apresentaram uma atividade baixa em relação as demais, não chegando nem a 10% de atividade da vitamina C, e em torno de 25% da rutina. Assim conclui-se que essas amostras são as menos ativas, resultado também esperado devido a presença de compostos apolares nessas frações.

Os resultados podem ser melhor visualizados pelo gráfico 1.

Gráfico 1 - Porcentagem de Inibição do Complexo do Fosfomolibdênio



A figura 54 apresenta a visualização da reação de complexação com o fosfomolibdênio em triplicata.



Nota: [1] = branco [2] = fração acetato [3] = fração clorofórmio
 [4] = fração hexano 2 [5] = hiperina [6] = rutina [7] = vitamina C

Figura 54 – Reação de Complexação do Fosfomolibdênio

5.4.2 Potencial Antioxidante por Cromatografia em Camada Delgada

Este ensaio permite a visualização de substâncias com potencial antioxidante. Os resultados das cromatografias são mostrados na figura 55:

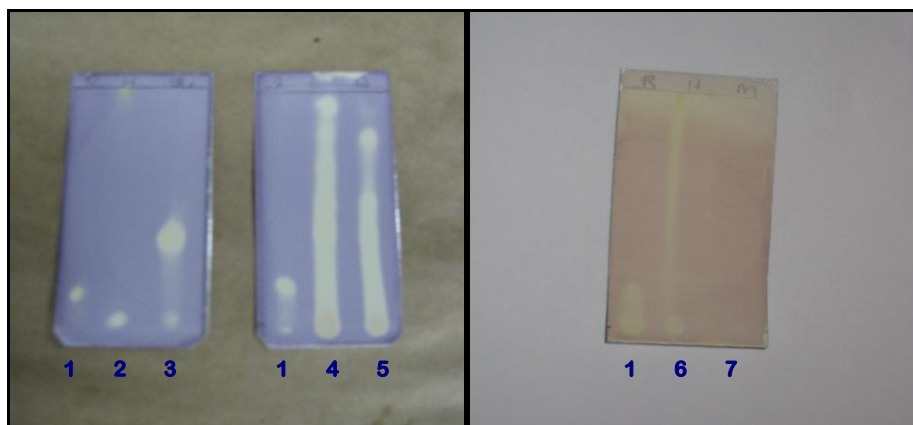


Figura 55 – Cromatografia em Camada Delgada com Revelador DPPH
 NOTA: Ponto 1/2/3/4/5/6/7 [rutina] [hexano 2] [hiperina] [clorofórmio] [acetato de etila] [hexano 1] [n-tetracosano]

Observando as fotos é possível visualizar que somente o n-tetracosano (ponto 7) não reagiu com revelador DPPH, pois não foi visualizada a coloração amarela indicativa de reação positiva, não apresentando um potencial antioxidante, e devido a este fato não foi realizada a quantificação desta substância pela redução do radical DPPH. Já as demais amostras, frações hexano 1 (ponto 6), hexano 2 (ponto 2), clorofórmio (ponto 4), acetato de etila (ponto 5) e hiperina (ponto 3) reagiram com o DPPH obtendo a coloração amarela, revelando um possível potencial antioxidante, dessa maneira todas essas amostras foram analisadas também pelo método quantitativo de redução do DPPH.

5.4.3 Ensaio pela Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

A molécula do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, radical livre e estável devido a localização de um elétron sobressalente ao longo da molécula como um todo, o qual não dimeriza, o que normalmente ocorre com os demais radicais livres, apresenta uma cor violeta intensa, e quando esta solução entra em contato com uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio o radical passa à sua forma reduzida, perdendo a coloração violeta se tornando amarelo pálido (MOLYNEUX, 2004).

Para cada amostra testada (hexano 1 e 2, clorofórmio, acetato de etila e hiperina) foi calculada a porcentagem de inibição do DPPH e por regressão linear foi possível calcular o IC₅₀, ou seja, a concentração da amostra que reduz 50% da concentração inicial de DPPH. Cada amostra foi comparada com os padrões de vitamina C e rutina. Os gráficos 2 a 8 apresentam as retas médias obtidas para cada teste.

Gráfico 2 – Curva da Vitamina C pela Redução do DPPH

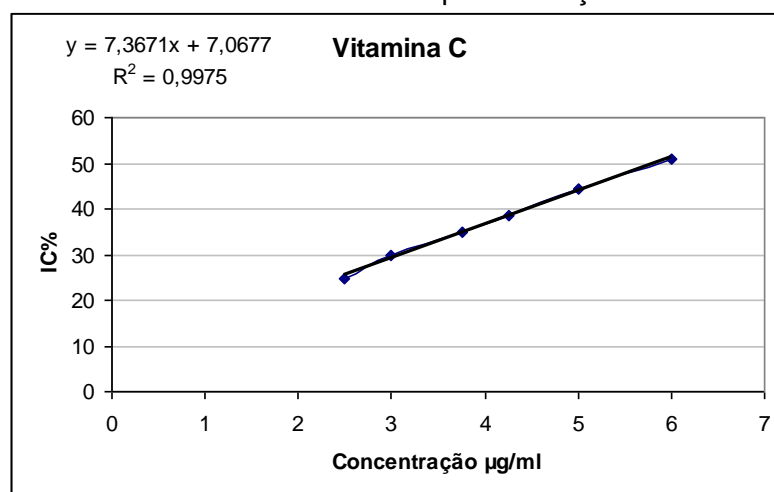


Gráfico 3 – Curva da Rutina pela Redução do DPPH

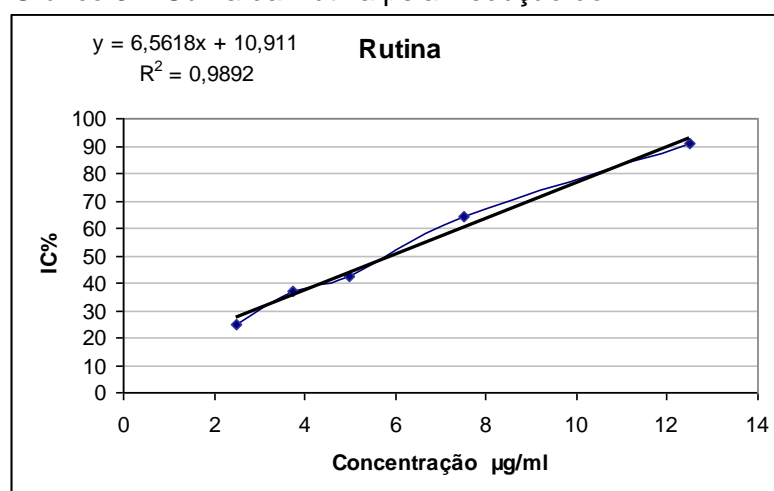


Gráfico 4 – Curva da Fração Clorofórmio pela Redução do DPPH

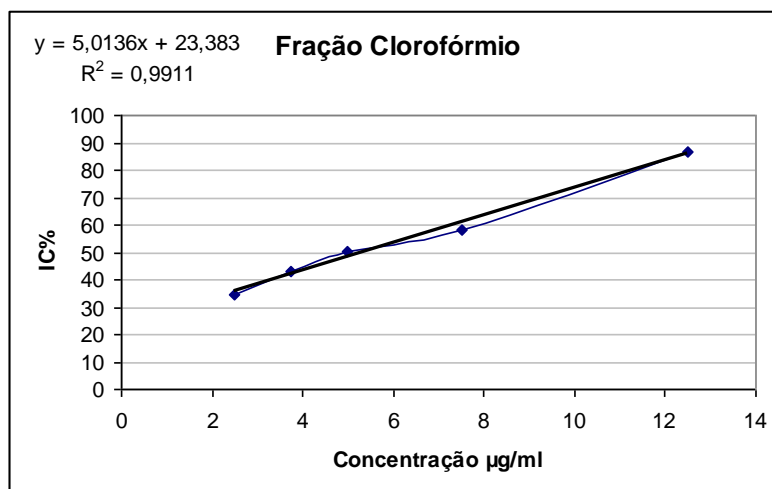


Gráfico 5 – Curva da Fração Acetato de Etila pela Redução do DPPH

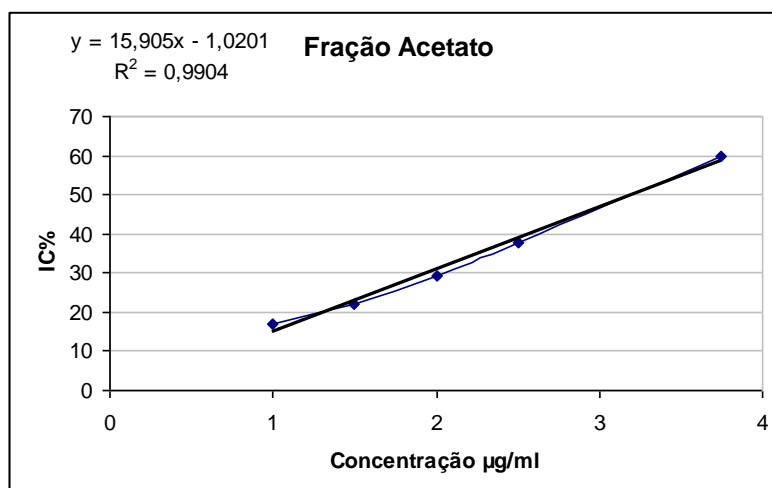


Gráfico 6 – Curva da Hiperina pela Redução do DPPH

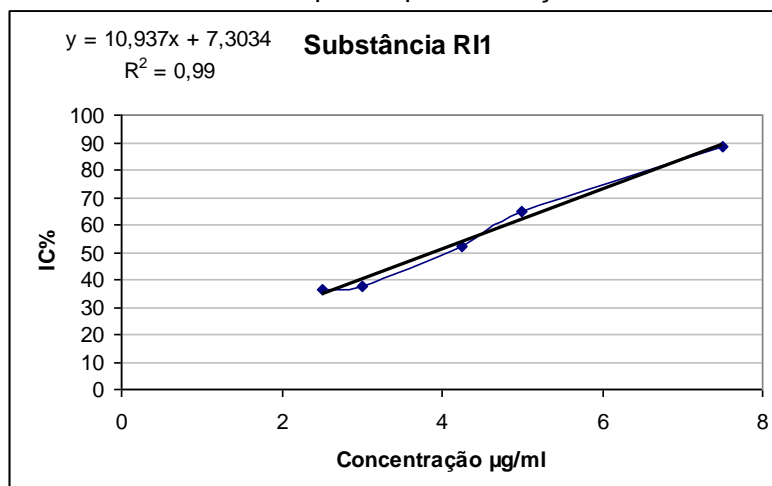


Gráfico 7 – Curva da Fração Hexano 1 pela Redução do DPPH

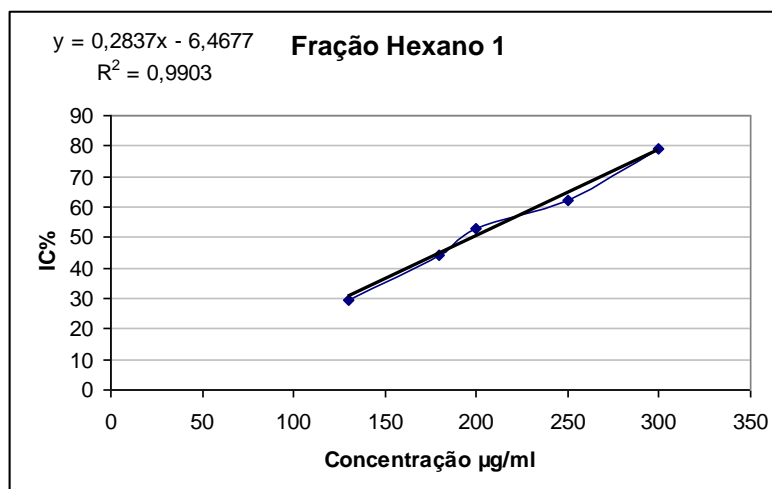
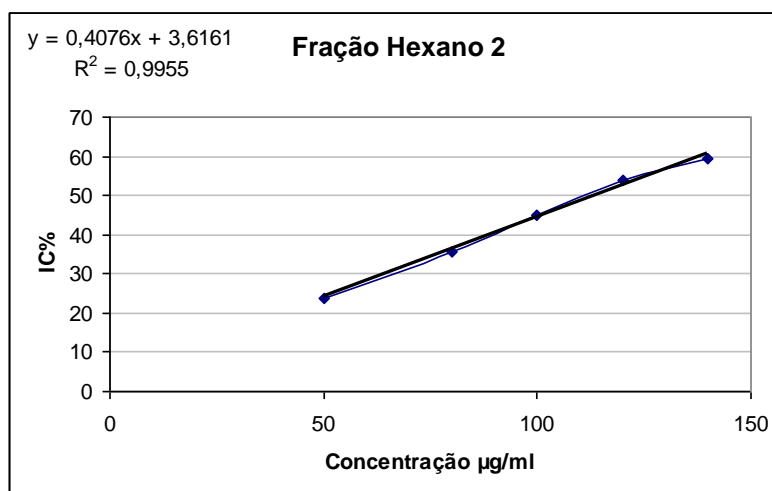


Gráfico 8 – Curva da Fração Hexano 2 pela Redução do DPPH



Os resultados de IC₅₀ são apresentados na tabela 12, estes correspondem às médias de três repetições \pm desvio padrão. Para verificar diferença estatística entre as amostras aplicou-se Anova, e para localização das diferenças o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 12 – Resultado de IC₅₀ e Teste de Tukey para Redução do DPPH

Amostra	IC ₅₀ (µg) ± SD	Classificação do Teste de Tukey*
Vitamina C	5,8053 ± 0,07877	a3
Rutina	5,9157 ± 0,03614	a3
Fração Hexano 1	199,8633 ± 1,54001	a5
Fração Hexano 2	113,4323 ± 0,34920	a4
Fração Acetato	3,2120 ± 0,00400	a1
Fração Clorofórmio	5,3333 ± 0,19177	a2 a3
Hiperina	3,8950 ± 0,01908	a1 a2

*Amostras classificadas no mesmo grupo não diferem estatisticamente.

Levando em consideração a análise estatística dos dados verificou-se que a fração clorofórmio tem atividade antioxidante igual aos padrões (vitamina C e rutina), pois não há diferença estatística significativa entre estas três amostras. A fração acetato apresenta o menor valor de IC₅₀ (3,2120 µg/mL ± 0,00400), este difere estatisticamente das demais frações e dos padrões. Pela análise ela pode ser considerada, entre as frações, a mais ativa. A substância isolada hiperina apresentou um resultado estatisticamente igual às frações acetato de etila e clorofórmio, porém difere dos padrões. Portanto pode-se dizer que, neste modelo, sua atividade antioxidante é maior do que a dos padrões analisados, ficando entre as frações acetato e clorofórmio. Já as frações hexano diferem entre si e das demais amostras, com valores de IC₅₀ superiores. Este resultado indica que as essas frações são menos ativas do que os padrões analisados e do que as demais amostras, pois é preciso uma quantidade maior destas amostras para reduzir 50% da concentração inicial de DPPH.

O potencial antioxidante encontrado para a hiperina, superior à atividade da vitamina C confirma os resultados relatados em trabalhos anteriores de Bernatoniene *et al.* (2008) e Piao *et al.* (2008).

5.5 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SOBRE *Artemia Salina*

Artemia salina é um microcrustáceo de água salgada utilizado como alimento vivo para peixes, facilmente encontrado em lojas especializadas em aquários, que pode ser utilizado para estimar a toxicidade através da concentração média letal (DL₅₀) (MEYER *et al.*, 1982).

Vários trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida. Este bioensaio também tem sido citado na avaliação prévia de extratos de plantas com possível atividade antitumoral e está sendo utilizado para estudo biológico inicial de um grande número de amostras para detecção simultânea de toxicidade e fototoxicidade (MEYER *et al.*, 1982).

Para o cálculo da DL₅₀ os resultados das amostras testadas (frações, n-tetracosano e hiperina) foram submetidos ao teste estatístico Probitos, e estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13 – Mortalidade de *Artemia salina* e DL₅₀

Amostra	Mortalidade/Concentração			DL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de Confiança de 95% (µg/mL)
	10 (µg/mL)	100 (µg/mL)	1000 (µg/mL)		
Fração Hexano 1	0	0	0	> 1000	–
Fração Hexano 2	0	1	4	> 1000	–
Fração Clorofórmio	0	0	0	> 1000	–
Fração Acetato de Etila	0	0	1	> 1000	–
Hiperina	0	0	0	> 1000	–
n-Tetracosano	0	3	0	> 1000	–
Sulfato de quinidina	16	10	18	50,12	35,80-70,16

Observando os dados é possível perceber que nenhuma das amostras se mostrou ativa contra o micro crustáceo *Artemia salina*, pois todas apresentaram um

resultado de DL_{50} superior a 1000 μ g/mL, concentração máxima para uma amostra ser considerada ativa segundo Meyer *et al.* (1982). Os controles feitos com os solventes metanol e clorofórmio não apresentaram influência sobre os resultados, pois nenhuma larva morreu na presença dos mesmos, do mesmo modo que o controle realizado com água salgada. Dessa maneira pode-se dizer que as frações do extrato de *Rourea induta*, bem como as substâncias testadas não possuem toxicidade frente ao teste realizado.

5.6 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

O termo alelopatia vem do grego *allelon* = de um para outro, *pathós* = sofrer. O conceito descreve a influência de um indivíduo sobre o outro e sugere que o efeito é realizado por biomoléculas (denominadas aleloquímicos) produzidas por uma planta e lançadas no ambiente (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Os agentes alelopáticos são, com algumas exceções, metabólitos secundários, os quais parecem não ter uma função metabólica central, podendo ser produzido em qualquer parte da planta e podendo variar a concentração dentro de uma mesma espécie. Porém o efeito alelopático raramente é provocado por uma única substância, geralmente se deve ao conjunto delas (MALHEIROS e PERES, 2001). A atividade dos aleloquímicos tem sido usada como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas (defensivos agrícolas) (FERREIRA e AQUILA, 2000).

O bioensaio mais usado para testar a atividade alelopática é a inibição, ou, algumas vezes, a estimulação da germinação e do crescimento de sementes de espécies silvestres ou de culturas. É muito comum a confusão entre alelopatia e competição, enquanto a competição se dá pela retirada ou redução de fatores do meio ambiente, a alelopatia é caracterizada pela introdução de novos fatores (MALHEIROS e PERES, 2001).

5.6.1 Avaliação da Germinação

Para o teste de germinação foram calculados os índices de velocidade de germinação (IVG) de cada amostra (frações, n-tetracosano e hiperina), os quais foram submetidos ao teste estatístico de Scott-Knott, cujos resultados são apresentados na tabela 14.

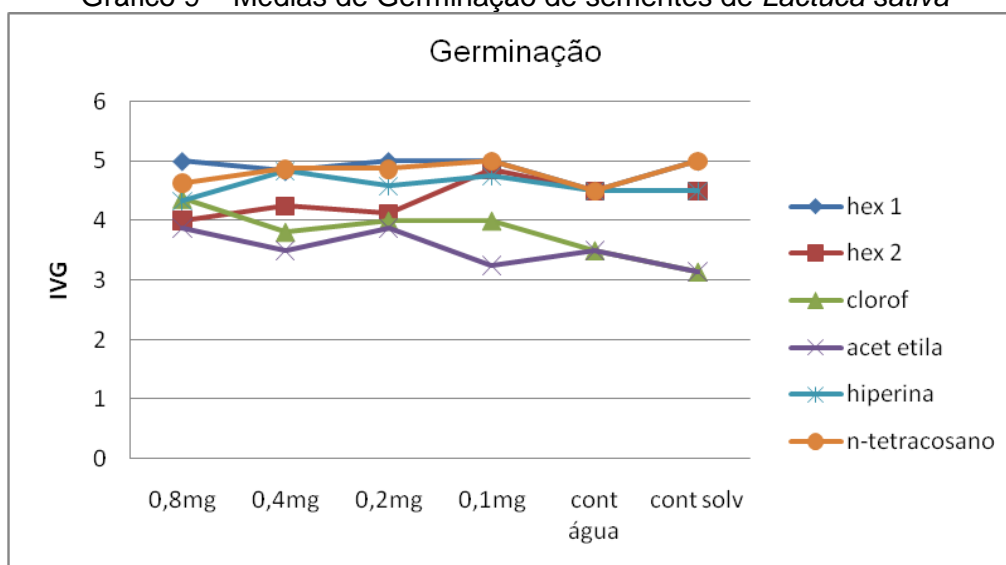
Tabela 14 - Teste de Scott-Knott para o Índice de Velocidade de Germinação das Sementes de *Lactuca sativa*

Amostra	Concentração				Controle Água	Controle Solvente
	0,8 mg	0,4 mg	0,2 mg	0,1 mg		
Fração Hexano 1	5,00 a1	4,83 a1	5,00 a1	5,00 a1	4,50 a1	5,00 a1
Fração Hexano 2	4,00 a1	4,25 a1	4,12 a1	4,87 a1	4,50 a1	4,50 a1
Fração Acet. de Etila	3,87 a1	3,49 a1	3,87 a1	3,25 a1	3,50 a1	3,14 a1
Fração Clorofórmio	4,37 a1	3,81 a1	4,00 a1	4,00 a1	3,50 a1	3,14 a1
Hiperina	4,33 a1	4,83 a1	4,58 a1	4,75 a1	4,50 a1	4,50 a1
Tetracosano	4,63 a1	4,87 a1	4,87 a1	5,00 a1	4,50 a1	5,00 a1

*amostras seguidas da mesma numeração não diferem estatisticamente.

Com base no teste estatístico pode-se concluir que nenhuma das amostras apresentou influência sobre a germinação das sementes de *Lactuca sativa*, pois as amostras não diferem estatisticamente, todas pertencem ao mesmo grupo (a1) de classificação, sendo iguais aos controles água e solvente.

A ausência de variação pode ser observada no gráfico 9.

Gráfico 9 – Médias de Germinação de sementes de *Lactuca sativa*

5.6.2 Avaliação do Crescimento

A análise do crescimento foi feita através do teste estatístico de Scott-Knott para as médias de crescimento da radícula e hipocótilo de sementes de *Lactuca sativa* na presença das frações e das substâncias n-tetracosano e hiperina provenientes do extrato de *Rourea induta*, os resultados do teste estão na tabela 15.

Analisando os dados obtidos é possível perceber que a fração hexano 2 (FH2) e o n-tetracosano apresentaram influência sobre o crescimento do hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa*, nas concentrações de 0,8 e 0,4 mg para FH2 e 0,4 mg para n-tetracosano. Essas amostras apresentaram valores estatisticamente diferentes dos padrões utilizados no teste nas quatro repetições realizadas. Os valores encontrados são menores do que os padrões e demonstram que nessas concentrações ocorreu inibição do crescimento do hipocótilo. Para o crescimento da radícula não houve influência.

Tabela 15 - Teste de Scott-Knott para Avaliação do Crescimento da Radícula e Hipocótilo de Sementes de *Lactuca sativa*.

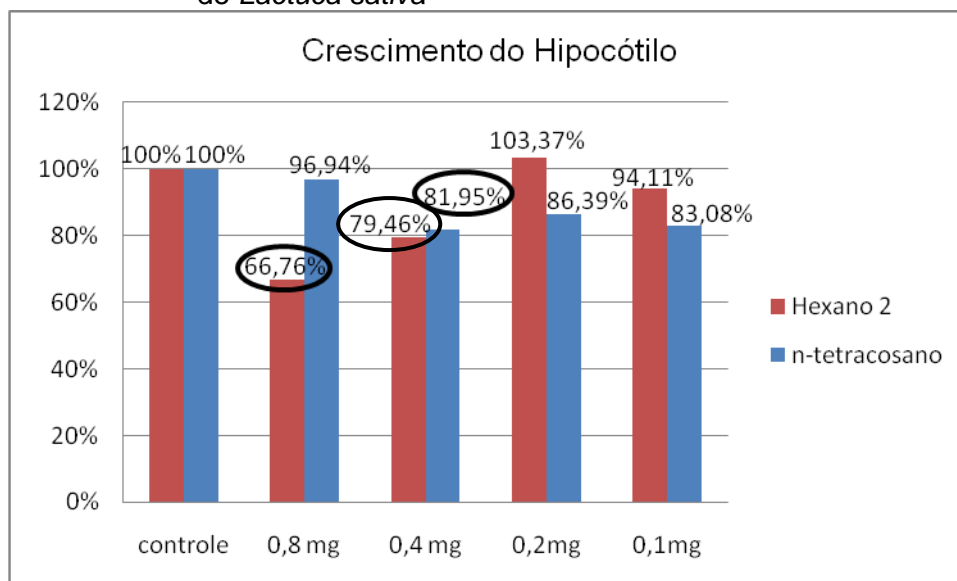
Tratamento	Repetição	Radícula (média mm)						Hipocótilo (média mm)					
		FH1	FH2	FAE	FCL	HIP	n-TETR	FH1	FH2	FAE	FCL	HIP	n-TETR
0,8 mg	1	33,60 a1	23,60 a1	21,20 a1	25,40 a1	27,20 a1	31,80 a1	31,80 a1	19,75 a1	21,80 a1	25,00 a1	29,80 a1	32,20 a2
	2	36,00 a1	15,60 a1	24,80 a1	25,80 a1	25,60 a1	36,00 a1	32,00 a1	15,40 a1	26,40 a1	23,00 a1	24,20 a1	36,00 a2
	3	35,80 a1	32,40 a1	26,20 a1	25,60 a1	26,40 a1	28,80 a1	32,40 a1	23,00 a1	24,40 a1	27,00 a1	28,40 a1	29,80 a2
	4	40,00 a1	31,40 a1	28,40 a1	25,00 a1	24,40 a1	32,00 a1	34,40 a1	21,20 a1	27,40 a1	26,00 a1	28,40 a1	28,80 a2
0,4 mg	1	32,20 a1	31,20 a1	27,00 a1	22,20 a1	27,80 a1	34,00 a1	37,00 a1	24,60 a1	24,00 a1	24,60 a1	30,60 a1	26,40 a1
	2	32,60 a1	27,40 a1	24,60 a1	28,60 a1	24,40 a1	35,80 a1	35,40 a1	22,20 a1	23,20 a1	29,40 a1	23,20 a1	27,40 a1
	3	26,40 a1	25,00 a1	28,00 a1	31,60 a1	26,60 a1	30,20 a1	30,40 a1	22,60 a1	25,60 a1	27,60 a1	26,80 a1	25,60 a1
	4	29,40 a1	31,00 a1	21,25 a1	26,20 a1	31,20 a1	30,20 a1	28,80 a1	25,00 a1	22,50 a1	27,20 a1	30,20 a1	27,80 a1
0,2 mg	1	39,40 a1	29,60 a1	28,40 a1	31,00 a1	31,40 a1	32,80 a1	35,40 a1	32,20 a2	26,40 a1	28,20 a1	25,00 a1	32,00 a2
	2	36,00 a1	31,20 a1	26,20 a1	23,00 a1	28,20 a1	29,20 a1	32,00 a1	30,40 a2	22,20 a1	23,60 a1	24,20 a1	24,60 a1
	3	32,80 a1	27,00 a1	31,00 a1	23,20 a1	33,00 a1	33,20 a1	32,00 a1	31,20 a2	22,60 a1	22,40 a1	28,20 a1	25,60 a2
	4	28,00 a1	27,80 a1	27,20 a1	23,00 a1	31,60 a1	33,80 a1	20,60 a1	29,00 a2	23,40 a1	26,00 a1	25,00 a1	30,80 a2
0,1 mg	1	28,80 a1	27,00 a1	25,60 a1	27,40 a1	29,00 a1	30,80 a1	34,80 a1	30,40 a2	26,40 a1	26,40 a1	26,40 a1	30,20 a2
	2	34,00 a1	29,80 a1	22,60 a1	27,40 a1	32,60 a1	30,20 a1	35,60 a1	28,40 a2	25,20 a1	24,60 a1	26,00 a1	28,20 a1
	3	36,60 a1	26,60 a1	25,00 a1	28,20 a1	29,40 a1	29,20 a1	37,40 a1	26,60 a2	26,20 a1	25,80 a1	24,00 a1	23,50 a1
	4	28,75 a1	23,60 a1	26,60 a1	28,60 a1	30,00 a1	38,20 a1	34,00 a1	26,40 a2	26,20 a1	23,20 a1	29,80 a1	26,80 a1
Cont. Água	1	34,20 a1	31,80 a1	15,25 a1	15,25 a1	31,80 a1	34,20 a1	32,40 a1	31,20 a2	20,75 a1	20,75 a1	31,20 a1	32,40 a2
	2	38,00 a1	32,40 a1	27,25 a1	26,60 a1	32,40 a1	38,00 a1	35,40 a1	32,20 a2	28,20 a1	28,20 a1	32,20 a1	35,40 a2
	3	32,80 a1	28,60 a1	25,00 a1	25,20 a1	28,60 a1	32,80 a1	30,00 a1	28,80 a2	24,80 a1	24,80 a1	28,80 a1	30,00 a2
	4	32,80 a1	18,00 a1	24,25 a1	24,25 a1	18,00 a1	32,80 a1	33,00 a1	26,60 a2	26,50 a1	26,50 a1	21,60 a1	33,00 a2
Cont. Solvente	1	30,00 a1	24,20 a1	26,60 a1	26,60 a1	24,20 a1	30,00 a1	30,00 a1	29,00 a2	24,40 a1	24,40 a1	23,20 a1	30,00 a2
	2	28,40 a1	28,80 a1	30,00 a1	30,00 a1	28,80 a1	28,40 a1	29,40 a1	28,00 a2	27,00 a1	27,00 a1	28,00 a1	29,40 a2
	3	32,00 a1	29,20 a1	27,00 a1	27,00 a1	29,20 a1	32,00 a1	29,60 a1	32,20 a2	23,40 a1	23,40 a1	32,20 a1	29,60 a2
	4	31,40 a1	32,00 a1	18,60 a1	18,60 a1	32,00 a1	31,40 a1	32,00 a1	32,20 a2	21,20 a1	21,20 a1	32,20 a1	32,00 a2

Nota: FH1 – fração hexano 1; FH2 – fração hexano 2; FAE – fração acetato de etila; FCL – fração clorofórmio; HIP - hiperina; n-TETR – n-tetracosano.

*Médias seguidas pela mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente.

A inibição encontrada para as amostras da fração hexano 2 (FH2) e do n-tetracosano pode ser melhor observada no gráfico 10.

Gráfico 10 – Porcentagem de Crescimento do Hipocótilo de Sementes de *Lactuca sativa*



A fração hexano 2 apresentou uma inibição de 33,24% na concentração de 0,8 mg e 20,54% em 0,4 mg. Já o n-tetracosano inibiu o crescimento do hipocótilo em 18,05% com 0,4 mg de concentração.

Geralmente os efeitos causados tendem a ser dependentes da concentração dos aleloquímicos, sendo mais acentuados em concentrações mais altas, como ocorreu em FH2. Mas alguns autores afirmam que os efeitos alelopáticos podem escapar deste padrão, pois resultam de um somatório de alterações moleculares, o que pode ser comprovado pelo resultado do n-tetracosano, que com concentração de 0,8mg não foi observado nenhum efeito e com 0,4mg inibiu o crescimento do hipocótilo (MARASCHIN-SILVA e AQUILA, 2006). O uso de hidrocarbonetos como pesticidas é bem conhecido, o que justifica o efeito inibitório deste composto (SIDDQUI *et al.*, 2004).

As demais amostras não apresentaram influências sobre o crescimento da radícula nem do hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa*, estatisticamente os resultados dessas amostras são iguais aos padrões, ou seja, as substâncias encontradas nessas amostras não apresentam um efeito tóxico sobre o crescimento das sementes de alface.

5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

5.7.1 Difusão em Ágar

Na difusão em Ágar logo que o disco impregnado com amostra entra em contato com a superfície úmida do ágar, a água é absorvida pelo papel de filtro e a substância impregnada se difunde para o meio, de tal forma que a concentração da substância imediatamente adjacente ao disco pode exceder ao próprio disco. À medida que aumenta a distância em relação ao disco ocorre uma redução logarítmica da concentração até alcançar um ponto onde o crescimento bacteriano na superfície do ágar já não é mais inibido, o resultado é um halo de inibição de crescimento ao redor do disco (KONEMANN et al., 1993), o qual indica a atividade antibacteriana.

As médias dos halos de inibição encontrados para cada microorganismo frente a cada amostra (frações, n-tetracosano e hiperina) são apresentadas na tabela 16.

Tabela 16 - Média dos Halos de Inibição por Difusão em Ágar

Amostras	Médias dos halos de inibição (mm)					
	Concentrações (µg)	<i>S.epidermidis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Fração	1000	-	-	-	-	-
Hexano 1	500	-	-	-	-	-
Fração	1000	-	-	-	-	-
Hexano 2	500	-	-	-	-	-
Fração	1000	12,3	7,6	-	-	-
Clorofórmio	500	-	-	-	-	-
Fração Acet. de Etila	1000	15	7,6	-	-	-
	500	10	-	-	-	-
	1000	9,3	-	-	-	-
Hiperina	500	7	-	-	-	-
	1000	-	-	-	-	-
Tetracosano	500	-	-	-	-	-
Cloranfenicol	30	36,8	26,5	28,2	27	15
Controle solvente		-	-	-	-	-

Os resultados demonstram que a fração acetato de etila e a fração clorofórmio tem atividade contra *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus aureus*. Para a bactéria *S. epidermidis* houve inibição nas duas concentrações testadas da fração acetato de etila, e para clorofórmio somente na concentração de 1000µg (figura 56). A hiperina apresentou atividade contra este microrganismo nas duas concentrações, com um halo de inibição ligeiramente menor. Já para *S. aureus* ocorreu inibição somente na concentração de 1000µg para as duas frações (acetato de etila e clorofórmio), portanto pode-se dizer que a cepa de *S. epidermidis* se mostrou mais sensível a essas amostras. Para as demais bactérias não houve inibição do crescimento.

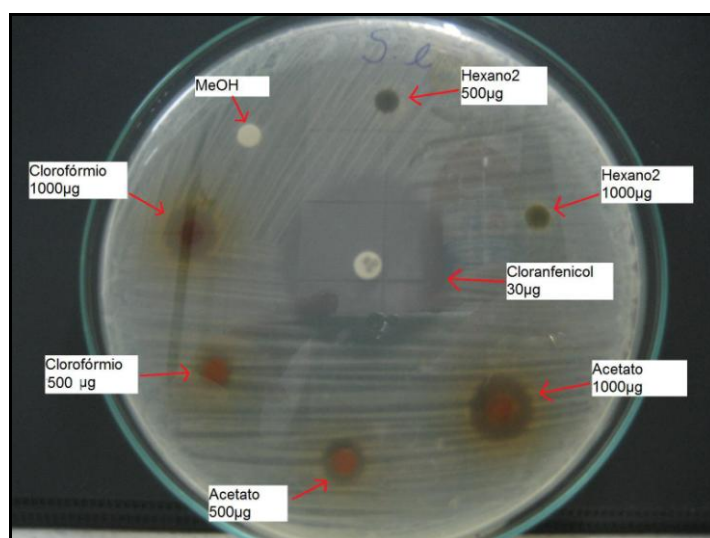


Figura 56 – Atividade Antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis*

O *S. aureus* é a bactéria mais virulenta do gênero, é conhecido por causar endocardite, gastroenterite, pneumonia e infecções de pele e vários tipos de intoxicações, e o *S. epidermidis* é o habitante normal da pele e mucosas podendo causar endocardites e alguns tipos de infecções associadas à implantação de próteses cardíacas, articulares e ventriculares, além de ser um patógeno oportunista em infecções do trato urinário (MEDLINE PLUS, 2009).

As frações hexanos, bem como o n-tetracosano não apresentaram inibição em nenhum dos microrganismos testados. A hidrofília dos constituintes químicos das amostras é determinante para a difusão no meio de cultura, uma vez que este meio

é aquoso, desta maneira constituintes lipofílicos, como os encontrados nessas amostras, tem dificuldade de difusão no meio, e conseqüentemente o contato com a bactéria inoculada no meio é menor, este fato pode explicar a ausência de halo de inibição para estas amostras.

5.7.2 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Neste teste, após a inoculação dos microrganismos em meios de cultura com as amostras em diferentes diluições, e o tempo necessário de incubação em temperatura favorável, verificou-se o primeiro tubo onde não houve crescimento bacteriano, ou melhor, onde não ocorreu turvação, correspondente a concentração inibitória mínima (DIAS, 2005).

Foram testadas as amostras que apresentaram atividade no método da difusão em ágar: fração acetato de etila, clorofórmio e hiperina, contra as bactérias *S. epidermidis* e *S. aureus*.

A fração hexano 1 foi testada devido a dificuldade de difusão da mesma no ágar, mas por causa da sua baixa solubilidade em água não foi possível concluir o teste, deste modo a fração hexano 2 e o n-tetracosano, que também são pouco hidrossolúveis, não foram testados.

Segundo Holetz et al. (2002) os extratos que apresentam uma concentração inibitória menor que 100µg/mL tem uma atividade antibacteriana considerada boa, se for entre 100-500µg/mL é moderada, de 500-1000µg/mL é fraca e acima de 1000µg/mL considera-se inativo.

Para as frações clorofórmio e acetato de etila ocorreu inibição somente para *S. aureus* na diluição 1:1 (1000µg/mL), já para *S. epidermidis* o crescimento bacteriano foi normal em todas as concentrações, contrariando o resultado do teste de difusão em ágar. Isso pode ter ocorrido devido à separação de componentes dessas frações na difusão, provavelmente alguma substância dessas amostras tenha atividade e esta conseguiu difundir melhor na superfície do ágar conseguindo inibir o crescimento bacteriano desta cepa, mas quando misturada em solução no meio com os demais compostos esta atividade não foi representativa. Pode-se

considerar então que a concentração inibitória mínima dessas amostras contra *S. epidermidis* é maior do que 1000µg/mL, sendo inativos.

A hiperina demonstrou atividade contra os dois microrganismos testados na diluição 1:1 (1000µg/mL) (figura 57).

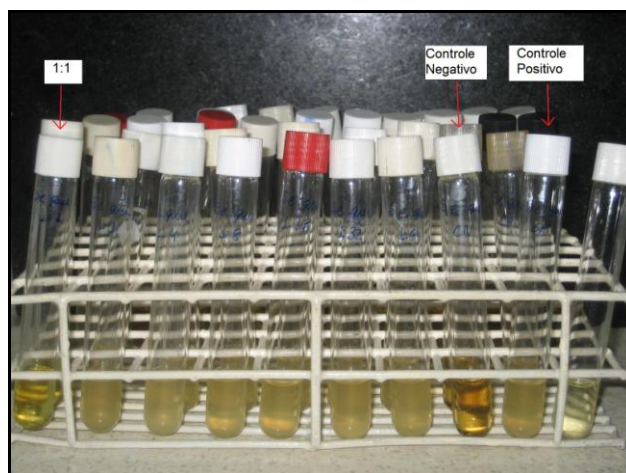


Figura 57 - Concentração Inibitória Mínima da Hiperina contra *S. epidermidis*

Com base nos resultados pode-se dizer que a atividade antibacteriana das frações acetato de etila e clorofórmio do extrato de *Rourea induta* é fraca contra *S. aureus*, e para hiperina é fraca contra *S. aureus* e *S. epidermidis*.

6 CONCLUSÃO

Considerando os objetivos propostos para este trabalho de estudo da composição fitoquímica e avaliação das atividades antioxidante, microbiológica, alelopática e toxicidade pode-se fazer algumas conclusões:

- A espécie *Rourea induta* Planch, pertencente à família Connaraceae, não apresenta descrição na literatura sobre sua composição fitoquímica. Em uma pesquisa fitoquímica preliminar, esta espécie evidenciou a presença de grupos fitoquímicos como: flavonóides (flavonóis e flavonas), cumarinas, triterpenos, taninos condensados, antocianidinas e amino grupos. Foram isolados e identificados cinco compostos, um hidrocarboneto de cadeia longa (n-tetracosano) e quatro flavonóides: um foi identificado como quercetina, e os outros três como seus derivados; quercetina-3-O- α -arabinofuranosideo, quercetina-3-O- β -xilosideo e quercetina-3-O- β -galactosideo (hiperina).
- A atividade antioxidante, nos dois métodos testados (redução do complexo do fosfomolibdênio e do radical DPPH) foi bem expressiva. As frações acetato de etila e clorofórmio, devido à grande quantidade de flavonóides encontrada, e a substância isolada hiperina demonstraram atividade superior à capacidade antioxidante da vitamina C.
- O ensaio alelopático revelou inibição do crescimento do hipocótilo das sementes de *Lactuca sativa* em torno de 20-30% na presença de duas amostras (hexano 2 e M1), e nenhuma amostra demonstrou influência sobre a germinação.
- Na atividade antimicrobiana de difusão em gel verificou-se que as frações acetato e clorofórmio inibem o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, e para este último microrganismo também foi observada atividade da substância hiperina. Na diluição em caldo evidenciou-se a atividade da hiperina contra os *S. aureus* e *S. epidermidis* com concentração inibitória mínima de 1000 μ g/mL, e das frações acetato e clorofórmio contra *S. aureus* na mesma concentração, atividade estas

consideradas fracas. Para os demais microrganismos não foi observada atividade de nenhuma amostra.

- O teste de toxidade não revelou atividade contra o microcrustáceo *Artemia salina*, pois todas as amostras apresentaram um valor de DL50 superior a 1000µg/mL, o que evidencia a baixa toxicidade das amostras.

A soma destes resultados abre espaço para a busca de outras atividades das amostras testadas, principalmente das frações acetato de etila e clorofórmio pelo seu potencial antioxidante, bem como das substâncias identificadas.

REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of Flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- AHAMADU, A. A., *et al.* Flavonoid Glycosides from *Byrsocarpus coccineus* Leaves. Schum. and Thonn (Connaraceae). **African Journal of Traditional, Complimentary and Alternative Medicines**, v.4, n.3, p.257-260, 2007.
- AKINDELE, A. J.; ADEYEMI, O. O. Evaluation of the Antidiarrhoeal Activity of *Byrsocarpus coccineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, p.20-25, 2006.
- AKINDELE, A. J.; ADEYEMI, O. O. Antiinflammatory Activity of the Extract of *Byrsocarpus coccineus*. **Fitoterapia**, v.78, p.25-28, 2007a.
- AKINDELE, A. J.; ADEYEMI, O. O. Antipyretic Activity of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn (Connaraceae). **International Journal of Pharmacology**, v.3, n. 4, p. 357-361, 2007b.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications**. CRC Press, New York, 2006.
- ANDRADE, C. A., *et al.* Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.231-235, 2007.
- AQUINO, R., *et al.* Phenolic Constituents and Antioxidant Activity of an Extract of *Anthurium versicolor* Leaves. **Journal of Natural Products**, v.64, p.1019-1023, 2001.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radical: a practical case. **Trends in Food Science & Technology**, v.11, p.419-421, 2000.
- BALESTRIN, L. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopática, antibacteriana e antioxidante de *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae**. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- BEHLING, E. B., *et al.* Flavonóide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. **Alimentos e Nutrição**. v.15, n.3, p.285-292, 2004.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.
- BERNATONIENE, J., *et al.* Free radical-scavenging activities of *Crataegus monogyna* extracts. **Medicina**, v. 44, n.9, p. 706-712, 2008.
- BERO, J., *et al.* *In vitro* antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.122, p.439-444, 2009.

BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V.C. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos**. Itajaí, UNIVALI, 2003.

BRITANNICA, Encyclopædia Online. **Connaraceae**. Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/132916/Connaraceae>>. Acesso em 15 jun. 2009.

BÜRGER, D. Ações da Quercetina como Agente Cicatrizante. **Revista Ciência em Curso**, v.3, n.2, 2008.

CONFORTI, F., *et al.* Antioxidant activity of methanolic extract of *Hypericum triquetrifolium* Turra aerial part. **Fitoterapia**, v.73, p.479-483, 2002.

COSTA, T. A. A. **Cerrado Brasileiro**. Disponível em: <http://201.67.44.181/portal/2008/Segundo_semestre/portal/CERRADO%20BRASIL%20-%201%BAano.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2009.

CRONQUIST (1968). **Sistemática de Angiospermas do Brasil, Classificação Segundo Cronquist**, v.2, 1984.

DALL'STELLA, D. S. G. **Estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) e de suas ações antibacteriana, antifúngica, alelopática, antioxidante e toxicológica**. Curitiba, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

DIAS, J. F. G. **Estudo alelopático aplicado de *Aster lanceolatus*, Willd.** Curitiba, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: Uma Área Emergente da Ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v.12, p.175-204, 2000.

FERRETTI, P. **Plantas do Cerrado**. Disponível em: <www.plantasdocerrado.com.br>. Acesso em: 20 set. 2009.

FLORA Brasiliensis, a obra. ***Rourea induta***. Disponível em: <www.florabrasiliensis.cria.org.br>. Acesso em: 15 nov. 2007.

FONSECA, L. C. M.; PROENÇA, C. E. B. Connaraceae. **Flora do Distrito Federal**. Brasília: Embrapa/Ministério da Agricultura e do Abastecimento, v.2, 2002.

FORERO, E. Uma nueva especie mexicana de *Rourea* (Connaraceae). **Caldasia**, Bogotá, v.29, n.1. p. 19-21, 2007.

HE, Z-D., *et al.* Rourinoside and Rouremin, antimalarial constituents from *Rourea minor*. **Phytochemistry**, v.67, p.1378-1384, 2006.

HERBARIO. **Plantas medicinais e aromáticas**. Disponível em <www.herbario.com.br>. Acesso em: 10 nov. 2007.

HOLETZ, F. B., *et al.* Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, 2002.

IBAMA. **Ecossistemas brasileiros, Cerrado.** Disponível em <<http://www.ibama.gov.br/ecossistemas/cerrado.htm>>. Acesso em: 07 fev. 2009.

JIAN-QIN, J., *et al.* Studies on The Chemical Constituents of *Rourea microphylla* (Hook. Et arn) Planch. **Acta Botanica Sinica**, v. 32, n.5, p.376-379, 1990.

JOLY, A. B. **Botânica, introdução à taxonomia vegetal.** 7.ed. São Paulo, 1985.

KONEMAN, E. W., *et al.* **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** 2.ed. São Paulo: Medicina Panamericana Editora do Brasil Ltda, 1993.

KUWABARA, H., *et al.* Tricin from a Malagasy Connaraceous plant with potent antihistaminic activity. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1273-1275, 2003.

LENZA, E., *et al.* Biologia reprodutiva de *Rourea induta* Planch. (Connaraceae), uma espécie heterostílica de cerrado do Brasil Central. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v.31, n.3, p. 389-398, 2008.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.20, p.297-301, 1992.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais nativas e exóticas.** São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: Guia Ilustrado para Identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

LHUILIER, M. A. **Contribution a L'etude Phytochique de Quatre Plantes Malgaches: *Agauri salicifolia* HOOK.F ex Oliver, *Agauria polyphylla* Baker (*Ericaceae*), *Tambourissa trichophylla* Baker (*Monimiaceae*) et *Embelia concinna* Baker (*Myrsinaceae*).** Toulouse, 2007. These (Docteur de L'institut National Polytechnique de Toulouse) - Sciences des Agroressources, École doctorale: Transferts, Dynamique des Fluides, Energie et Procédés.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The Systematic Identification of Flavonoids.** New York: Springer-Verlag, 1970.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. Alelopatia: interações químicas entre as espécies. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna.** Chapecó/SC: Argos Universitária, 2001.

MARASCHIN-SILVA, F.; AQUILA, M. E. A. Potencial alelopático de espécies nativas na germinação e crescimento inicial de *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.1, p.61-69, 2006.

MEDLINE PLUS. **Staphylococcal Infections**. Disponível em: <<http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/staphylococcalinfections.html>> Acesso em: 01 ago. 2009.

MENSOR, L. L., *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MEYER, B. N., *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Oxidales, Connaraceae**. Disponível em: <www.mobot.org>. Acesso em: 07 abr. 2008.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science Technology**, v.26, n.3, p.211-219, 2004.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna Farmacêutica**, v.47, n.1, p.1-19, 1979.

PIAO, M. J. *et al.* Hyperoside prevents oxidative damage induced by hydrogen peroxide in lung fibroblast cells via an antioxidant effect. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1780, n.12, p.1448-1457, 2008.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

RECOR. **Reserva Ecológica do IBGE, O Cerrado Brasileiro**. Disponível em <<http://www.recor.org.br/cerrado/cerrado.html>>. Acesso em: 07 fev. 2009.

REDE DE SEMENTES DO CERRADO. **Rourea induta, taxonomia**. Disponível em <www.rededesementesdocerrado.com.br>. Acesso em: 20 nov. 2007.

RODRIGUES, J. **Uso Sustentável da Biodiversidade Brasileira: Prospecção Químico-Farmacológica em Plantas Superiores: Miconia spp.** Araraquara, 2007. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista.

ROMEIRO, R. S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: Ed. UFV, 2001.

SANTOS, P. M. L.; SCHRIPSEMA, J.; KUSTER, R. M. Flavonóides O-glicosilados de *Croton campestris* St. Hill. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p. 321-325, 2005.

SASAKI, C. M. **Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Alelopáticas e Antimicrobianas das Partes Aéreas de Pterocaulon lorentzii Malme (Asteraceae)**. Curitiba, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SASAKI, D.; MELLO-SILVA, R. **Cerrado Flora de Pedregulho, São Paulo, Brasil**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2009. Disponível em: <http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/guide_pdfs/213%20Cerrado-SPaulo.pdf>. Acesso em 15 maio 2009.

SIDDIQUI, B. S., *et al.* Analysis of Insecticidal *Azadirachta indica* A. Juss. Fractions. **Zeitschrift für Naturforschung**, v.59c, p.104-112, 2004.

SILVA, M. B. S. Flavonóides com Capacidade Antioxidante. **Química Aplicada**. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa. Disponível em: <dq.fct.unl.pt>. Acesso em: 20 jul. 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, F. X.; MORRIL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.

SOSSAE, F. C. **Plantas Medicinais**. Disponível em: <www.educar.sc.usp.br/biologia/prociencias/medicinais.html>. Acesso em: 20 nov. 2007.

VVDENSKAYA, I. O., *et al.* Characterization of Flavonols in Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) Powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.188-195, 2004.

WATSON, L.; DALLWITZ, M. J. **The families of flowering plants**: descriptions, illustrations, identification and information retrieval. Disponível em: <<http://delta-intkey.com>>. Acesso em: 01 jun 2007.

YAN, X., *et al.* Antioxidant Activities and Antitumor Screening of Extracts from Cranberry Fruit (*Vaccinium macrocarpon*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.5844-5849, 2002.

ZAHNG, X., *et al.* Antioxidant Activity of Anthraquinones and Flavonoids from Flower of *Reynoutria sachalinensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v.28, n.1, p.22-27, 2005.